

3079

**Untersuchungen zur intrazellulären  
Verteilung des Zinks in Skelettmuskel,  
Herzmuskel und Leber von Schwein,  
Rind und Taube; zugleich eine Literatur-  
studie über Metabolismus  
und fleischtechnologische Bedeutung  
des Zinks**

**Paul Unsinn**

**1975**



Aus dem Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der  
Lebensmittel tierischen Ursprungs  
des Fachbereichs Tiermedizin  
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr.h.c. L. Kotter

Arbeit angefertigt  
unter Leitung von Prof. Dr. W. Kreuzer

Untersuchungen zur intrazellulären Verteilung des  
Zinks in Skelettmuskel, Herzmuskel und Leber von  
Schwein, Rind und Taube; zugleich eine Literatur-  
studie über Metabolismus und fleischtechnologische  
Bedeutung des Zinks

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
des Fachbereichs Tiermedizin  
der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

von  
Paul Unsinn  
aus  
Maria-Rain

München 1975

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs  
Tiermedizin der Universität München

Dekan: Prof. Dr. B. Vollmerhaus

Referent: Prof. Dr. W. Kreuzer

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. J. Gropp

Tag der Promotion: 18. Juli 1975



# INHALTSVERZEICHNIS

|                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------|----|
| A. Einleitung                                                            | 1  |
| B. Literatur                                                             | 2  |
| I. Zink-Physiologie                                                      | 2  |
| 1. Geschichte                                                            | 2  |
| 2. Physik und Chemie                                                     | 2  |
| 3. Resorption                                                            | 4  |
| 4. Statik und Dynamik der Zinkverteilung                                 | 6  |
| 5. Ausscheidung                                                          | 10 |
| 6. Zinkabhängiger Stoffwechsel                                           | 11 |
| 7. Zinkbedarf - Mangelkrankheiten                                        | 14 |
| 8. Zink bei der Entstehung verschiedener Krankheiten                     | 19 |
| 9. Toxikologie - Umweltproblem                                           | 22 |
| II. Bedeutung des Zinks im Muskelfleisch                                 | 25 |
| 1. Zinkkonzentration im Muskel                                           | 25 |
| 2. Metabolisierung der Muskelkationen                                    | 27 |
| 1) Bindungsstärke von Kationen                                           | 28 |
| 2) Bedingungen der Metallbindung                                         | 29 |
| 3) Chemie der Zinkbindung                                                | 31 |
| 4) Funktionen der Metallbindung                                          | 31 |
| 5) Ankergruppen für Metalle                                              | 32 |
| 6) Moleküle der Metallbindung; Zinkproteide                              | 34 |
| 7) Zinkbindung an morphologische Strukturen                              | 41 |
| 3. Zink bei der Muskelfunktion                                           | 42 |
| 4. Muskelenzyme und Zink                                                 | 43 |
| 5. Muskelfarbe und Zink                                                  | 44 |
| 6. Löslichkeit der Muskelproteine - Beziehung zum Zn                     | 45 |
| 7. Beziehung des Zinks zum Wasserbindungsvermögen des Fleisches          | 46 |
| 1) Wahres Hydratwasser                                                   | 47 |
| 2) Freies Wasser                                                         | 48 |
| 3) Immobilisierung des freien Wassers                                    | 48 |
| 4) Wasserbindung in der Muskelstruktur                                   | 49 |
| 5) Beziehungen der Muskelkationen zum WBV                                | 50 |
| 6) Alkalimetalle und WBV                                                 | 51 |
| 7) Sarkoplasmasalze und WBV                                              | 52 |
| 8) Muskelzink und WBV                                                    | 52 |
| 8. Muskelzink und ph-Wert des Fleisches                                  | 53 |
| 9. Muskel-ATP und Zink                                                   | 55 |
| 10. Zusammenfassung der Korrelationen des Zinks mit Fleischeigenschaften | 56 |
| 11. Zink bei der Fleischverarbeitung                                     | 57 |
| 1) Zinkgehalt und Abschätzung von Fleischeigenschaften                   | 58 |
| 2) Behandlung der Tiere vor dem Schlachten                               | 58 |
| 3) Änderung des Wasserbindungsvermögens durch Zinkaustausch              | 59 |
| III. Intrazelluläre Zinkverteilung                                       | 61 |
| 1. Zelluläre Strukturen                                                  | 62 |
| 1) Zellmembran                                                           | 63 |
| 2) Zytoplasma                                                            | 63 |
| 3) Zellkern                                                              | 64 |
| 4) Mitochondrien                                                         | 65 |

|                                                                                           |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5) Lysosomen                                                                              | 69  |
| 6) Mikrobodies                                                                            | 71  |
| 7) Endoplasmatisches Reticulum                                                            | 71  |
| 8) Ribosomen                                                                              | 72  |
| 9) Golgi-Apparat                                                                          | 73  |
| 10) Zentriolen                                                                            | 73  |
| 2. Zellorganellen und Fleischkunde                                                        | 74  |
| 3. Zellfraktionation im Schwerkraftfeld                                                   | 75  |
| 1) Zerschneiden der Zelle                                                                 | 77  |
| 2) Suspensionsmedium                                                                      | 78  |
| 3) Separation der Partikel                                                                | 79  |
| 5. Fraktionierung von Muskelzellen                                                        | 80  |
| 6. Bezugsgrößen von Mineralen in Zellfraktionen                                           | 82  |
| 7. Verteilung von Zellinhaltsstoffen                                                      | 84  |
| 8. Konzentration des Zinks in Zellfraktionen                                              | 87  |
| 9. Subzelluläre Verteilung anderer Minerale                                               | 89  |
| 10. Weitere Methoden zur Untersuchung intrazellulärer Mineralverteilungen                 | 91  |
| <b>C. Eigene Versuche</b>                                                                 |     |
| I. Beschreibung und Beurteilung der Zink-, Trockensubstanz-, Asche- und Proteinbestimmung | 93  |
| 1. Problemstellung und Prinzip                                                            | 93  |
| 2. Trockensubstanz- und Aschebestimmung                                                   | 94  |
| 3. Zinkbestimmung                                                                         | 94  |
| 4. Beurteilung der Methode                                                                | 96  |
| 1) Durchführbarkeit                                                                       | 96  |
| 2) Spezifität                                                                             | 96  |
| 3) Empfindlichkeit, Nachweis- und Bestimmungsgrenze                                       | 97  |
| 4) Richtigkeit                                                                            | 97  |
| 5) Genauigkeit                                                                            | 99  |
| 5. Darstellung der Ergebnisse und Statistik                                               | 100 |
| 6. Arbeitsvorschrift der TS-, Asche-, Zink- und Proteinbestimmung                         | 101 |
| II. Intrazelluläre Verteilung von Zink in Leber, sowie in Herz- und Skelettmuskel         | 103 |
| 1. Problemstellung                                                                        | 103 |
| 2. Methodik                                                                               | 103 |
| 3. Besprechung der Ergebnisse                                                             | 107 |
| 4. Diskussion                                                                             | 112 |
| III. Verteilung des Zinks in Eiweißfraktionen des Skelettmuskels                          | 116 |
| 1. Problemstellung                                                                        | 116 |
| 2. Methodik                                                                               | 116 |
| 3. Ergebnisse                                                                             | 118 |
| 4. Diskussion                                                                             | 121 |
| IV. Zinkbindung an Actomyosin                                                             | 123 |
| 1. Problemstellung                                                                        | 123 |
| 2. Methodik                                                                               | 123 |
| 3. Ergebnisse und Diskussion                                                              | 123 |
| 4. Fleischtechnologische Bewertung der Versuche                                           | 125 |
| <b>D. Zusammenfassung - Summary</b>                                                       | 127 |
| <b>E. Literaturverzeichnis</b>                                                            | 131 |

## A. Einleitung

Bei den biochemischen Vorgängen der Fleischentstehung wurde bisher mehr die Funktion der Organika als die Steuerung dieser Vorgänge durch Metallkomplexe untersucht. Metalle agieren bekanntlich als Aktivatoren und Inhibitoren von Enzymen, als Faktor der Hydratation und - fest oder locker gebunden - in prosthetischen Gruppen von Proteinen.

Unklar ist auch der Einfluß des Zinks, das im Muskel fast die Konzentration des Calciums erreicht und die des Eisens übertrifft. In dieser Arbeit soll durch Untersuchung der subzellulären Lokalisation des Zinks Einblick in seine chemischen und morphologischen Bindungsstellen gewonnen werden und eine Beziehung zu technologischen Fleischeigenschaften, wie Hydratation oder Fleischfarbe, gefunden werden.

## B. Literatur

### I. Physiologie des Zinks

#### 1. Geschichte

Das hebräische Wort kedem wird in das Griechische als kadmia oder kadmeia übernommen. Daraus entsteht in der Neuzeit der Name des Kadmiums. In Westeuropa entwickelt sich aus dem französischen Wort chalem(e), über das mittelhochdeutsche kalemine, Galmei.

Paracelsus erkennt 1525/26 das Zink im "Buch de Mineralibus" als Metall und benennt es Zinken (Werke I 3, 49, 58) oder Zink (Werke I 13, 105), was sprachlich eins ist mit Zincken = Zacke: das Metall setzt sich im Ofen in Zackenform an.

Die Geschichte der Zinkphysiologie wird in Tabelle 1 tabellarisch aufgeführt.

#### 2. Physik und Chemie

Zink ist ein weiches, weißes Metall mit bläulichem Schimmer. Es leitet Wärme und Elektrizität relativ schlecht. Das eher spröde Metall kann bei 110 - 150°C gewalzt oder zu Draht ausgezogen werden. Seine Stellung im Periodensystem demonstriert folgendes Schema (Abb. 1).

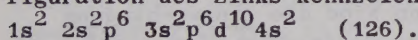
|            |    |    |    |    | Ib | IIb |                 |
|------------|----|----|----|----|----|-----|-----------------|
| 4. Periode | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30  | → Nicht-Metalle |
|            | Mn | Fe | Co | Ni | Cu | Zn  |                 |
|            |    |    |    |    |    | 48  |                 |
|            |    |    |    |    | Ag | Cd  |                 |
|            |    |    |    |    |    | 80  |                 |
|            |    |    |    |    | Au | Hg  |                 |

Abbildung 1: Stellung des Zinks im Periodensystem

Tabelle 1: Daten zur Geschichte der Zinkphysiologie

|         |                                                                                                                            |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1869/70 | Raulin: Zink ist essentiell für <i>Aspergillus niger</i>                                                                   |
| 1877    | Raoult u. Breton: Zink im Körper der Tiere ist "normal"                                                                    |
| 1877    | Lechartier u. Bellamy: Sur la presence du zinc dans les corps des animaux et dans les végétaux                             |
| 1905    | Mendel u. Bradley: Zink im Hämosycotypin, dem Atempigment einer Schnecke                                                   |
| 1911    | Bertrand u. Javillier: Zink ist essentiell für <i>A. niger</i>                                                             |
| 1919    | Birchner: Weil Zink im Eidotter und in der Milch vorkomme, müsse es eine biologische Funktion innehaben                    |
| 1919    | Rost: Zink ist in allen Organen enthalten; dies sei nur von forensischer Bedeutung                                         |
| 1919    | Delezénne: 5 ppm Zn (TS) im Schlangengift der Kopra                                                                        |
| 1920    | Gaiya: Alle Organismen enthalten Zink                                                                                      |
| 1922/24 | Bertrand u. Benson: In den bisherigen Zinkmangel-diäten fehlen noch weitere Wachstumsfaktoren                              |
| 1926    | Sommer u. Lipman: Zink in Pflanzen                                                                                         |
| 1926    | Lutz: Die Konzentration des Zinks in biologischem Material ist gleich der des Eisens, größer als die von Kupfer und Mangan |
| 1927    | Thompson, Marsh u. Drinker: Zink bei der Fortpflanzung                                                                     |
| 1927    | Hubbell u. Mendel: Zinkmangelkrankheit der Maus                                                                            |
| 1934/37 | Todd, Elvehjem u. Hart: Beweis der essentiellen Rolle des Zinks für Wachstum und Wohlergehen der Maus                      |
| 1938    | Hove, Elvehjem u. Hart: Zinkmangelkrankheit der Ratte                                                                      |
| 1935    | Bertrand: Herstellung einer zinkfreien Diät                                                                                |
| 1940    | Keilin u. Mann: Carboanhydrase ist ein Zinkenzym                                                                           |
| 1940    | Day u. McCollum: Zinkmangel der Ratte                                                                                      |
| 1955    | Tucker u. Salmon: Zink verhindert und heilt die Parakeratose des Schweines                                                 |
| 1955/56 | Vallee et al.: Zinkenzyme Carboxypeptidase, Glutamat-Dehydrogenase und Laktat-Dehydrogenase                                |
| 1957    | O'Dell u. Savage: Zink ist essentiell für Geflügel                                                                         |
| 1960/62 | Miller et al.: Zink ist essentiell für Wiederkäuer                                                                         |

Der Schmelzpunkt des Zinks liegt bei 419,5°C; sein Siedepunkt bei 908,5°C; das spezifische Gewicht beträgt 7,15 g/cm<sup>3</sup>, das Atomgewicht 65,3785. Die Elektronen-Konfiguration des Zinks kennzeichnet die Formel:



Zink ist als Element edelgasähnlich; es ist leicht schmelzbar. Im Gegensatz zu den anderen Übergangsmetallen kann Zink nur eine Oxydationsstufe einnehmen (308). Es bildet tetraedrische Komplexe, z.B.  $Zn(NH_3)_4^{2+}$ .

Bekannte Zinkverbindungen sind das ZnO = Rotzinkerz (Smp. 1260°C), das amphotere  $Zn(OH)_2$ , das  $ZnCl_2$  (Smp. 318°C; Kp. 730°C), das  $ZnSO_4$  und das ZnS (126).

### 3. Resorption

Mannigfaltige Faktoren beeinflussen die Zinkresorption. (124, 199). Widersprüchliche Angaben liegen vor, ob Zink nach Angebot oder nach Bedarf resorbiert wird. Die Resorptionsrate richtet sich bei Wiederkäuern nach dem Zinkangebot. Bei Zinkmangeldiät werden bis zu 80 % des zugegebenen Zink-65 resorbiert (199). Kälber nehmen bei Zinkmangel vermehrt Zink-65 auf (197, 238). Gaben von stabilem Zink setzen die Zink-65-Resorption bei der Ratte herab (84). Postuliert wird ein Zink-Homeostasemechanismus (84, 198, 222). HUBER u. GERSHOFF (131) behaupten dagegen, Zink werde je nach Angebot resorbiert.

Daten für die Resorption von Zink-65 in Prozent der oral verabreichten Dosis sind für Mensch und verschiedene Tierarten aus der folgenden Tabelle ersichtlich.

Tabelle 2: Resorption von Zink-65 in % der oralen Dosis

| Species         | Resorption in % | Autor |
|-----------------|-----------------|-------|
| Mensch          | 50,8            | 276   |
| Schwein         | 39              | 169   |
| Schaf           | 10 - 20         | 187   |
| Stier           | 3 - 10          | 305   |
| Kalb 2,5 Monate | 51              | 199   |
| 4,5 Monate      | 13              | 199   |
| Ratte           | bis 98          | 122   |
| Gefl., Hahn     | 72; 37          | 137   |
| Henne           | 30; 56          | 137   |

Weitere Faktoren der Resorption sind die Zinkverbindung und der pH des Darminhaltes: Zinksulfat löst sich zwar besser in Wasser als Zinkoxid, doch unterscheiden sich die Resorptionsraten kaum (196). Zink wird jedoch aus alkalischem Milieu schlechter resorbiert als aus saurem.

Phytin, Phäophytin (214, 215, 255), Chlorophyllabkömmlinge und Phosphat (255) wirken wegen Komplexbildung

auf das Zink resorptionshemmend. Zink wirkt andererseits stimulierend auf die Darmphosphatase der Ratte (247). Phosphor vermindert in Gegenwart von Calcium die Zinkresorption (255); Zink wird im Darm an Calcium-Phosphat gebunden (304). Nach der gegensätzlichen Meinung von LEWIS et al. (171) heilt Phosphat die Parakeratose des Schweines. Pflanzeneiweiße binden Zink stärker als tierische (214, 215). Hochproteindiät erniedrigt deshalb (bei Mensch und Ratte) die Zinkresorption; das Plasmazink bleibt bei einem niedrigen Wert (276).

Zinkkomplexbildner können die Verfügbarkeit des Zinks steigern oder vermindern (215). Steigernd wirken Chelatbildner mit einer Stabilitätskonstanten für Zink zwischen 13 und 17; dazu gehören EDTA und Cystein (212). Vermindernd wirken Phosphat und Phytin, der Hexaphosphorester von Inosit (215). EDTA scheint dabei mit Phytin um das Zink zu konkurrieren. Calcium- und Zinksalze von Phytin sind in  $H_2O$  unlöslich, das Zinksalz der EDTA löst sich dagegen. Trotzdem scheint EDTA nicht resorbiert zu werden; es würde Zink im Blut binden und über die Nieren zur Ausscheidung bringen (215).

Bei pH 6 bildet Phytin einen Komplex mit fünf Zinkatomen; die Anwesenheit von Calcium fördert die Komplexbildung (44).

Bei Getreidekörnern befinden sich der Großteil des Phytins und 70 % des Zinks im Keim. Mit dem Keim werden das meiste Zink, sowie Phytin, Magnesium und Kalium entfernt (215). Phytin kommt nur in Pflanzen vor. Sein Zusatz zu Protein hemmt die Zinkresorption. Autoklavierung des Futters setzt Zink frei (215).

Kupfer verdrängt Zink aus Proteinbindungen und verbessert somit seine Resorption (146). Zink seinerseits vermindert die Kupferresorption im Duodenum. Die Konkurrenz von Kupfer und Zink ist spezifisch und spielt sich an der Darmwand ab (50). Die Bindungsstelle oder der Carrier soll ein Protein der Mucosazellen darstellen (53). Kadmium

verringert die Resorption von oral verabreichtem Zink-65 (198).

Die Verfügbarkeit des Zinks kann je nach Ernährungs-  
gewohnheiten bzw. Art der Fütterung erheblich schwanken. Tiere können ungefähr 60 % des Zinks von Getreide oder Ölfrüchten verwerten (215). Aus ungenügend gekochter oder verdauter Pflanzennahrung kann es dagegen nicht mobilisiert werden (255). Der Pankreassaft setzt Zink aus der Nahrung frei (235).

Mit dem Alter geht die Zinkresorption zurück. Nach MILLER et al. (199) resorbieren Kälber mehr Zink-65 (51 %) als Jungrinder (13 %). Bei Zinkmangel gleichen sich die Resorptionsraten in etwa.

Der Resorptionsmechanismus des Zinks ist wenig erforscht. Nach bisherigen Untersuchungen wird Zink in den oberen Teilen des Dünndarmes resorbiert. In den ersten Dezimetern des Dünndarmes wurde aber auch eine beachtliche Zinksekretion festgestellt (193). Nach MILLER (199) steuern die weichen Organe über die Darmmucosa Resorption und endogene Ausscheidung. Einen Carrier für Kupfer und Zink in der Darmmucosa beschreibt VAN CAMPEN (50). Weitere Transportmechanismen wurden untersucht (82, 190). Ungeklärt ist noch die Zinkanreicherung in den Paneth'schen Körnerzellen (67).

#### 4. Statik und Dynamik der Zink-Verteilung

Der Körper des erwachsenen Menschen enthält 2 - 4 g Zink (4 - 6 g Eisen). Über die Organverteilung geben die Tabellen 3 Auskunft. Periodische Schwankungen des Zinkspiegels im Organismus bzw. in einzelnen Geweben schränken jedoch den Wert solcher Tabellen ein (120, 230).

Tabelle 3: Zinkgehalt von Geweben

| Organ<br>Tierart | µg/g<br>Frischgew. | µg/g TS        | Lit./Jahr |
|------------------|--------------------|----------------|-----------|
| <u>Leber</u>     |                    |                |           |
| Kalb             | -                  | 110            | 198/68    |
| Kalb             | -                  | 125-170        | 252/70    |
| Kalb             | -                  | 271            | 166/70    |
| Rind             | -                  | 20-150         | 252/70    |
| Rind             | -                  | 100-200        | 166/70    |
| Ratte            | 30                 | -              | 304/62    |
| Ratte            | 36-42              | -              | 109/53    |
| Mensch           | 55                 | -              | 305/62    |
| Mensch           | -                  | 245            | 71/40     |
| <u>Pankreas</u>  |                    |                |           |
| Kalb             | -                  | 160-170        | 252/70    |
| Mensch           | -                  | 135            | 71/40     |
| <u>Milz</u>      |                    |                |           |
| Kalb             | -                  | 72             | 198/68    |
| Mensch           | -                  | 72             | 71/40     |
| <u>Niere</u>     |                    |                |           |
| Kalb             | -                  | 67             | 198/68    |
| Schwein          | 40                 | -              | 305/62    |
| Ratte            | 23                 | -              | "         |
| Mensch           | 55                 | -              | "         |
| Mensch           | -                  | 186            | 71/40     |
| <u>Lunge</u>     |                    |                |           |
| Kalb             | 62                 | -              | 198/68    |
| Mensch           | 67                 | -              | 71/40     |
| <u>Prostata</u>  |                    |                |           |
| Kaninchen        | -                  | 1296           | 305/62    |
| Ratte, lat. Teil | -                  | 50.000/g Asche | 184/53    |
| Mensch           | -                  | 859            | "         |
| <u>Sperma</u>    |                    |                |           |
| Eber             | -                  | 300-900        | 305/62    |
| Mensch           | -                  | 910-2930       | 184/53    |
| <u>Hoden</u>     |                    |                |           |
| Kalb             | -                  | 74             | 198/68    |
| <u>Knochen</u>   |                    |                |           |
| Kalb             | -                  | 90-105         | 252/70    |
| Kalb, Tibia      | -                  | 81             | 198/68    |
| Kalb, Tibia      | -                  | 69,2-69,6      | 199/69    |
| Kalb, Rippe      | -                  | 73,5           | "         |
| Ratte            | 186-257            | -              | 174/70    |
| Mensch, Rippe    | 32,9±22,9          | -              | 282/68    |
| Mensch, Remur    | 46,3±7,2           | -              | "         |

Tabelle 3; Fortsetzung

| Organ<br>Tierart     | µg/g<br>Frischgew.             | µg/g TS             | Lit./Jahr |
|----------------------|--------------------------------|---------------------|-----------|
| <u>Blut</u>          |                                |                     |           |
| Kalb                 | 1,3-3,5                        | -                   | 252/70    |
| Schaf, Rind          | 2,5-3,5                        | -                   | 305/62    |
| Kaninchen            | 2,5                            | -                   | "         |
| Mensch               | 6,5-9,0                        | -                   | 245/63    |
| Mensch               | 7,0-8,8                        | -                   | 305/62    |
| Mensch               | -                              | 30,5-32,3           | 71/40     |
| <u>Plasma</u>        |                                |                     |           |
| Kalb                 | 0,8-1,2                        | -                   | 252/70    |
| Ratte                | 1,0-1,3                        | -                   | 247/70    |
| Mensch               | 0,846±0,36                     | -                   | 234/67    |
| Mensch               | 1,09±0,02                      | -                   | 22/52     |
| Mensch               | 0,76-1,23                      | -                   | 61/68     |
| <u>Serum</u>         |                                |                     |           |
| Kalb                 | 1,37-1,47                      | -                   | 305/62    |
| Ferkel               | 0,6                            | -                   | "         |
| Ratte                | 1,45±0,005                     | -                   | 174/70    |
| Ratte                | 0,96                           | -                   | 132/69    |
| Mensch               | 1,12±0,02                      | -                   | 120/71    |
| Mensch               | 0,8-1,4                        | -                   | 250/69    |
| <u>Erythrozyten</u>  |                                |                     |           |
| Mensch               | 13,0                           | -                   | 245/63    |
| "                    | 12,1                           | -                   | 306/49    |
| "                    | 11,8-17,8                      | -                   | 305/62    |
| "                    | 1 µg pro 1 Milliarde Zellen    | -                   | 341/56    |
| <u>Leukozyten</u>    |                                |                     |           |
| Mensch               | 3,6                            | -                   | 306/49    |
| "                    | 22,5 µg pro 1 Milliarde Zellen | -                   | 341/56    |
| <u>Milch</u>         |                                |                     |           |
| Kuh                  | 3,0-5,0                        | -                   | 305/62    |
| Kuh, Kolostrum       | 20,0                           | -                   | "         |
| Kuh                  | 1,0-18,7                       | -                   | 210/64    |
| Mensch               | 1,6-13,9                       | -                   | "         |
| <u>Haar</u>          |                                |                     |           |
| Schwein              | 175-200                        | -                   | 26/69     |
| Schaf                | 100-150                        | -                   | 305/62    |
| Kalb                 | 116,4                          | -                   | 198/68    |
| Ratte, Albino        | -                              | 220 <sup>±</sup> 17 | 221/73    |
| Mensch, Iran, Stadt  | 216-288                        | -                   | 247/68    |
| Land                 | 194                            | -                   | "         |
| Mensch, New York     | 80-160                         | -                   | 37/69     |
| Mensch               | 200-250                        | -                   | 305/62    |
| Mensch (Fingernägel) | 200                            | -                   | 305/62    |

Hinweise auf die Dynamik des Zinkstoffwechsels geben:

### 1. Auswirkungen von Zinkmangel oder -überschuß

Als Organe mit konstantem Zinkspiegel werden meist angegeben: Muskulatur (199, 304), Darm (304), Haut (171), Gehirn (199), Erythrozyten (304) und die Einzelkörperzelle (109). Auf einen Zinkmangel sprechen an: der Plasmazinkspiegel (132, 199), Enzyme (222), die Zn-65-Resorption (247), die DNA-Synthese (284) und eventuell die Zinkkonzentration in Leber, Knochen und Haar (131, 199). Auf Zinküberschuß steigern die meisten Organe den Zinkgehalt (131, 199, 200) - nicht jedoch Muskulatur und die Milchdrüse (52, 199). Nach KIRCHGESSNER et al. (147, 221) und BERSCHNEIDER (26) bleibt bei einer Diät von 15 - 100 ppm Zink auch der Zinkspiegel des Haares, der Leber, der Knochen und des Ganzkörpers auf einem Plateau.

### 2. Auswirkungen von Zink-Antagonisten und -Komplexbildnern

Kadmium verdrängt nach Beobachtungen von ANKE et al. (9) bei Hennen Zink aus Muskulatur, Knochen und Federn. Der Magen zeigt Zinkmangelsymptome. Die Milch von Ziegen wird bei Cd-Fütterung zinkarm. Calciumentzug in der Futterration führt nach LEWIS et al. (124, 171) beim Schwein zu einer Zunahme des Leber-, Nieren-, Haar- und Knochenzinks. EDTA steigert die Zinkausscheidung im Harn; eventuell wird Zink aus dem Weichgewebe aktiviert (172, 276, 333).

### 3. Zinktransportvorgänge

Es wird über aktive und passive Transportmechanismen berichtet (82, 120, 254). Vom Blutzink befinden sich 85 % in den Erythrozyten, 3 % in den Leukozyten, weniger als 1 % in den Thrombozyten und 12 % im Serum (222). Zink wird im Blut weniger an die Zellen als an Plasmaproteine gebunden (123, 187, 245, 341). Die Ursachen periodischer Schwankungen des Zinkspiegels sind noch unbekannt (120, 330).

### 4. Verteilung des <sup>65</sup>Zink

Bei oraler Verabreichung von Zink-65 kommt es nach 1 - 3

Tagen zu einem Plasma- und Leberpeak. Es folgt eine Redistribution in Muskulatur, Erythrozyten, Haut, ZNS und Knochen. Die Muskulatur nimmt noch mehrere Wochen post applicationem Zink-65 auf (8, 57, 70, 84, 86, 92, 137, 169, 187, 192, 199, 235, 254, 276, 302, 312).

### 5. Zinkspeicher

Manche Autoren halten das Skelettsystem für einen Zinkspeicher (131, 146). Das Plasmazink erniedrigt sich bei Zinkmangel sehr schnell. Vorherige Zinkgaben ändern dies nicht. Offensichtlich ist ein Zinkspeicher nicht schnell verfügbar (64, 132, 201, 312).

### 5. Ausscheidung

Die Hauptmenge des Zinks wird mit dem Pankreassaft über die Feces ausgeschieden (27, 192). Größere Mengen Zink gibt dabei der Anfangsteil des Dünndarmes ab, wovon die Hauptmenge jedoch reabsorbiert wird (193). Gaben von Chelatbildnern können die Ausscheidung im Harn erhöhen (228, 276); ähnliches wurde bei bestimmten Krankheiten (23, 154, 250, 321) und bei Hungerkuren beobachtet. Der Mensch scheidet dann bis zu 5 mg Zink pro Tag über die

|                   |                                       |
|-------------------|---------------------------------------|
| _____ Darm        | _____ Darmdrüsen                      |
|                   | _____ Pankreassaft (Carboxypeptidase) |
|                   | _____ Galle                           |
| _____ Niere       |                                       |
| _____ Haut        | _____ Hautdrüsen                      |
|                   | _____ Gefiederabnützung (137)         |
|                   | _____ Hautabschilferung               |
| _____ Milch (199) |                                       |
| _____ Eier (137)  |                                       |

Abbildung 2: Ausscheidungswege des Zinks

Nieren aus (276). Das Harnzink ist vom Plasmazinkspiegel unabhängig (305). Seine Konzentration resultiert aus der Stoffwechselfunktion der Niere. Einen Überblick über die Ausscheidungswege des Zinks geben Tabelle 4 und Abbildung 2.

Tabelle 4: Zinkausscheidung mit den Feces und dem Harn

| Species      | $\frac{\mu\text{g Zn}}{\text{g TS}}$ | mg/Tag  | % der<br>Einnahme | Lit. / Jahr |
|--------------|--------------------------------------|---------|-------------------|-------------|
| <u>Feces</u> |                                      |         |                   |             |
| Kalb         | 250-310                              | -       | -                 | 252/70      |
| Kalb         | -                                    | 53-58   | -                 | 199/69      |
| Stier        | -                                    | -       | 20                | 305/62      |
| Schwein      | -                                    | 78,7    | -                 | 169/70      |
| Hund         | -                                    | -       | 25                | 57/65       |
| Mensch       | -                                    | -       | 16,8-21,6         | "           |
| Mensch       | -                                    | 10      | -                 | 312/56      |
| Mensch       | -                                    | -       | 20-75             | 276/70      |
| <u>Harn</u>  |                                      |         |                   |             |
| Stier        | -                                    | -       | 0,25              | 305/62      |
| Schwein      | -                                    | -       | 1-5               | 145/60      |
| Schwein      | -                                    | 0,13    | -                 | 169/70      |
| Mensch       | -                                    | 0,3-0,6 | -                 | 276/70      |
| Mensch       | 1,31                                 | -       | -                 | 120/71      |
| Mensch       | -                                    | 0,55    | -                 | 169/70      |
| Mensch       | -                                    | -       | 0,1-0,3           | 131/70      |
| Mensch       | -                                    | -       | 0,9-3,4           | 57/65       |

## 6. Zinkabhängiger Stoffwechsel

Zink spielt eine essentielle Rolle bei der Synthese der Nukleinsäuren (21, 83, 160, 175, 201, 264, 330, 331, 336, 338). Die Ergebnisse wurden sowohl durch Versuche an Mikroorganismen als auch an höheren Tieren gewonnen. Zinkmangel verlangsamt die Inkorporierung von  $^3\text{H}$ -Thymidin in Leber-DNA (35, 201, 284), den Einbau von  $^{14}\text{C}$ -Orotsäure (Muttersubstanz der Pyrimidinsynthese) in RNA (253) und des  $^{32}\text{P}$ -Orthophosphat in Leber-Nukleotide in vivo (335).

Möglicherweise blockiert  $Zn^{2+}$ , ähnlich wie Schwermetalle die RNase. Nach WILLIAMS u. CHESTERS (336) geht bei einem Zinkmangel mehr die DNA- und RNA- als die Protein-synthese zurück. Zink-65 wird nach WESER et al. (30) besonders von den Zellkernen eines Homogenates einer Rattenleber aufgenommen. Nach BARTHOLOMEW et al. (17, 18) steigt der Zink-65-Gehalt des Zellkernes an den ersten drei Tagen post applicationem. Zink stabilisiert nach SHIN u. EICHHORN (270) die Tertiärstruktur der DNA.

Der Einfluß des Zinks auf den Protein-Stoffwechsel läßt sich zum Teil über die Nukleinsäuresynthese erklären. Zinkmangel senkt die Proteinsyntheserate (129, 160, 235, 255, 264, 336). WACKER et al. (318, 319) beobachteten bei *Euglena gracilis* auf zinkarmem Nährboden eine verminderte RNA-Synthese bei erhöhten Aminosäure- und DNA-Konzentrationen. Sie schlossen daraus, daß Zink für den Syntheseschritt von RNA zu Protein erforderlich sei. Zinkmangel verhindert nach HSU et al. (129) den Einbau von Cystein in Eiweiß, wobei Schwefel vermehrt via Niere abgegeben wird. Fraglich bleibt, ob Zink an der Transskription (190) oder an einem anderen Schritt der Protein- oder Nukleinsäuresynthese beteiligt ist (330, 331). Zink beeinflusst jedoch nicht die Zellkern-Proteinsynthese, die ja von Fe, Mn und Cr stimuliert wird (329).

Die proteolytischen Enzyme Carboxypeptidase (307) und renale Dipetidase (49) enthalten bei einigen Tierarten Zink. Zink ist ein Baustein in der Tertiär- und Quartärstruktur von Proteinen (337).

Zink beeinflusst den Kohlehydrat-Stoffwechsel sowohl über das zinkhaltige Enzym Laktat-Dehydrogenase (311) als auch über das Hormon Insulin (341). Die Glucoseaufnahme epididymaler Fettpolster erfährt durch Zink eine Steigerung, Zinkmangel hebt sie auf (241). Bei einem Mangel an Zink wird das gesamte Körperfett abgebaut; die freien Fett-

säuren des Plasmas sind dann erhöht (201).

Die Interaktion des Zinks im Mineralstoffwechsel wird deutlich bei der Zinkvergiftung: Die Folge ist eine Kupfermangelanämie (166, 252). Dagegen steigt der Kupfergehalt der Leber bei Zinkmangel an (166, 174). Zink ist im Wechselspiel mit Calcium an der Knochenmineralisation beteiligt (238). Bei einigen Tierarten enthält die Alkalische Phosphatase Zink (235).

Der Wirkungsmechanismus gewisser Hormone läßt sich nach BERSIN (27) durch Komplexbildung mit Metallen erklären, etwa bei der Penetration von Membranen. Berichtet wird über Zinkbindung an Insulin, ACTH, STH, Gonadotropine, Glucagon, Testosteron (154) und Bradykinin (27). Insulin bildet mit Zink Doppelmoleküle und höhere Aggregate. Die Sättigungsgehalte sind bei pH 5 circa 0,5 % Zink, bei pH 7 circa 2 % Zink. Der maximale Gehalt von 2,2 % entspricht einer Aufnahme von zwei Zinkionen pro Molekül (MG = 5750) (324). Ein Insulin-Zink-Komplex wurde in den zytoplasmatischen Grana der Inselzellen nachgewiesen (182). Histamin und Heparin bilden in den Gewebsmastzellen mit Zink einen Komplex (139). Die Wirkung des Histamins auf die glatte Muskulatur wird durch kleine Zinkmengen gesteigert, durch große gehemmt (300).

Die Vitamine Thiamin und Ascorbinsäure bilden Zinkkomplexe (27, 235). Durch Zink wird Vitamin A von der Leber ins Plasma mobilisiert. Eine Korrelation besteht zwischen Plasmazink und -Vitamin A (274).

Zink steigert bei Spaltpilzen innerhalb weniger Minuten nach einer Zugabe die Porphyrin-Synthese (156, 190, 250). Es bildet mit Porphyrinen Komplexe (188, 238, 250, 321), womit auch die Rolle des Zinks bei der Blutbildung verständlich wird. Bekannt ist eine Cu-Fe-Zn-Mangelanämie (154, 312). Ein Überschuß an Zink verdrängt Kupfer aus den Geweben. (238, 245).

Zink ist an der Regelung des vaskulären Systems beteiligt. Es normalisiert den Kadmium-induzierten Bluthochdruck (265) und wurde in typischer Lage in der Aortenwand nachgewiesen (80, 280).

Zink steht in Verbindung mit der Zellatmung; z.B. kann der Grundumsatz von Fischen anhand der Zink-65-Ausscheidung gemessen werden (70). Carboanhydrase und Laktat-Dehydrogenase sind Zinkenzyme (266). Zink beeinflusst auch Körperwachstum und Fruchtbarkeit. Die Bedeutung des Zinks bei der Haut-Funktion ist, was Keratinisierung und Wundheilung betrifft, allgemein bekannt (196, 235).

## 7. Zinkbedarf - Mangelkrankheiten

Die essentielle Bedeutung des Zinks wird häufig unterschätzt. Beachtung fand sie bisher nur bei der Herstellung von Schweine- und Geflügelfutter (124). Dabei fehlt es nicht an Daten über die Folgen eines Zinkmangels bei Mensch und Tier: beim Tier in Fütterung und Fleischerzeugung, beim Menschen als Faktor bei Gefäßkrankheiten, Hautveränderungen, Porphyropathien und Kadmiumtoxizität (154).

### 1. Faktoren des Zinkmangels

Grenzwerte der Zinkversorgung können wegen verschiedener Faktoren nur in Bereichen angegeben werden (215). Das Zinkangebot hängt stark vom Zufall ab. Häufig decken allein schon natürliche und zivilisatorische Quellen den Zinkbedarf (Kochgefäße, Wasserrohre, Geophagie). Nahrungs- und Futtermittelkonzentrationen fanden deshalb nicht immer die ihnen zukommende Beachtung.

Die Resorption des Nahrungszinks unterliegt den verschiedensten Einflüssen. Der Zinkumsatz kann gesteigert sein infolge chronischer Infektionen (238), rheumatischer

Arthritis (33), Leberzirrhose (305) und Nephrose (238). Vermehrter Zinkverlust tritt in tropischen Klimata durch Schweißsekretion (238) auf, ferner bei Blutverlust, z.B. infolge Hakenwurmbefalls: 100 Ancylostomatiden saugen am Tag 13 - 45 ml Blut, was einem Zinkverlust von 250  $\mu$ g entspricht (255).

Chelatbildner können die Verfügbarkeit des Zinks verbessern oder verschlechtern (215). Die meisten künstlichen Chelatbildner steigern, wie die Aminosäuren Cystein und Histidin, seine Verfügbarkeit (124, 212). Abhängig von der Aminosäurezusammensetzung der Nahrung können verschiedene Symptomenkomplexe beobachtet werden. Sojaprotein-Zinkmangeldiät erzeugt beim Huhn Wachstumsstillstand, "frizzled" Gefieder und Knochendeformationen ("swollen hock syndrome"). Bei Caseindiät treten jedoch Skelettveränderungen nicht auf, weil Cystein durch Komplexbildung das Zink resorbierbar macht (124). Histidin und auch Histanin beheben beim Huhn nur die Skelettanomalitäten, nicht aber die übrigen Zinkmangelsymptome (212). Beim Schwein kann man mit Histidingaben die Parakeratose heilen, nicht jedoch das Wachstum wiederherstellen, wobei eine Beeinflussung des vaskulären Systems vermutet wird. (212). Dagegen fördert die Aminosäure Arginin die Ausbildung von Zinkmangelsymptomen (124).

Der Aminosäurezusammensetzung des Nahrungsproteins kommt deshalb bei der Entstehung bzw. Verhinderung von Zinkmangelsymptomen erhebliche Bedeutung zu. Zink steigert den biologischen Wert von Pflanzenproteinen (214). Außerdem ist Zink aus Pflanzennahrung weniger leicht verfügbar als aus Futter- und Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs (215).

Der Antagonismus Calcium - Zink wird einerseits in einer Resorptionshemmung, andererseits in einer Konkurrenz auf zellulärer Ebene erklärt (146). Er ist beim Schwein von ganz besonderer Wichtigkeit, beim Menschen spielt er

offenbar keine Rolle (276). Calcium behindert die Zink-resorption vor allem bei Hoch-Phytin-Diät (215, 255). Nach LEWIS et al. (171) bringt eine Verringerung des Calciums von 1,2 % auf 0,5 % in der Schweineration bei 28 ppm Futterzink eine Heilung der Parakeratose. Eventuell erniedrigt Ca die Resorption des Zn nur bei einer Mangellage. (131). Nach Beobachtungen von SPENCER u. SAMACHSON (276) steigert Ca die Zn-Ausscheidung im Harn um bis zu 20 %. Nach Auffassung KIRCHGESSNERS (145, 146) wirkt sich der Zink-Calcium-Antagonismus nicht immer in gleicher Weise aus; in der praktischen Schweinefütterung bei Zulage von Calciumcarbonat wurde sogar erhöhte Zinkretention registriert.

Magnesium und Kobalt können Zinkmangelsymptome beseitigen und verschiedene Arzneimittel beeinflussen die Symptome der Zinkmangelkrankheit (124). So steigert das Coccidiostaticum DOT den Zinkgehalt des Mastkückens (147). Antirheumatica (Cortison, Phenylbutazon, Cloroquin, Aspirin) lindern die Symptome des Zinkmangels ebenso wie die der Kollagenkrankheiten (124, 212).

## 2. Pathogenese der Zinkmangelkrankheit

Erste Anzeichen betreffen fast immer Wachstum und Appetit. Noch vor diesen kommt es zu einer Reduzierung der Leber-RNA-Synthese und der Pankreas-Carboxypeptidase. Mangelsymptome können auch bei noch gefülltem Zinkspeicherewebe auftreten, was darauf zurückgeführt werden kann, daß das primäre Aktionszentrum einen extrem hohen turnover aufweist, oder das Zink an einer Stelle wirkt, wo es frei austauschbar ist (z.B. Alkohol-Dehydrogenase) (65, 201). HOEKSTRA (124) schließt aus der Vermehrung der Gamma-Globuline und dem herabgesetzten Albumingehalt des Blutes beim Zinkmangel des Schweines auf einen "Physiologischen entzündlichen Status". Zink ist nach BARNEY (16) zur Differenzierung von Knorpel- und Epithelzellen notwendig, was sich beim Zinkmangel in einer Fehlbildung von Mucopolysacchariden zu erkennen gibt. Im

Cäcum der Ratte wirkt sich diese Fehlbildung ein einer Überproduktion von Schleim und der Entstehung sogenannter goblet-Zellen aus (242).

### 3. Zinkangebot und Zinkbedarf

Über Zinkgehalte von Nahrungs- und Futtermitteln informiert Tabelle 5. Der Zinkgehalt von Nahrungsmitteln ist ausreichend in Fleisch, Leber, Ei, Grahambrot; ungenügend in

**Tabelle 5:** Zink in Nahrungs- und Futtermitteln

| Futtermittel         | µg Zn/g   | µg Zn/g TS | Lit.   |
|----------------------|-----------|------------|--------|
| Gras                 | -         | 30-50      | 3, 167 |
| Heu                  | -         | 20-30      | 252    |
| Weizen               | -         | 20-25      | 305    |
| Weizenkeime u.-kleie | 80-150    | -          | "      |
| Äpfel                | -         | 3          | 3      |
| Eialbumin            | -         | 2,5        | 194    |
| Eidotter             | 25        | -          | 238    |
| Casein               | 26        | -          | 194    |
| Kuhmilch             | 2,8-4,8   | -          | 194    |
| Rindfleisch          | 36-56     | -          | 24     |
| Rinderleber          | -         | 20-150     | 252    |
| Trinkwasser          | 0,04-0,65 | -          | 194    |

Kartoffeln, Bohnen, Äpfeln, Kuhmilch (1). Bei Gräsern bringt eine frühe Schnittzeit 40 % mehr Zink als eine späte (146). In Tabelle 6 sind Daten über den Zinkbedarf bei den Tierarten zusammengestellt. Der relative Zinkbedarf des Schweines ist zehnmal größer als der der Ratte (304). Für den Zinkbedarf der Babymaus ist das Kolostrum erforderlich (238).

### 4. Symptome des Zinkmangels

Sie äußern sich an Haut und Schleimhäuten in Form der Parakeratose. Zink ist essentiell bei der Keratinsynthese (130): bei Zinkmangel wird ein defektes weiches Keratin gebildet (201). Bei bestimmten Hautkrankheiten des Menschen wurden erniedrigte Plasmazinkspiegel nachgewiesen (91, 340). Histochemisch gleicht die Parakeratose des Schweines der Psoriasis des Menschen (5). Zink kann bei der Wundheilung

Tabelle 6: Zinkbedarf in mg/kg Futter-Trockensubstanz

| Species, Bedingungen                  | mg Zn/kg TS       | Lit .   |
|---------------------------------------|-------------------|---------|
| <u>Schwein</u> , praktische Fütterung | 30-40             | 304     |
|                                       | 45-50             | 305, 26 |
| Mastschwein                           | 50                | 146     |
| Mutterschwein                         | 40                | "       |
| <u>Geflügel</u>                       |                   |         |
| Huhn in Batterie, bei 1,6 % Ca        | 35                | 304     |
| als "available zinc"                  | 15-20             | "       |
| bei Sojaproteindiät                   | 24-39             | "       |
| bei Caseindiät                        | 19                | "       |
| <u>Rind</u> , praktische Fütterung    | 50-100            | 252     |
| bei 0,3 % Ca                          | 40                | "       |
| für jedes zusätzliche 0,1% Ca         | 16 ppm zusätzlich | "       |
| Mastrind                              | 30                | 146     |
| Kuh                                   | 50                | "       |
| Kalb                                  | 20                | "       |
| Kalb, gerade ausreichend              | 8,6               | 194     |

therapeutisch eingesetzt werden (192, 235, 240, 341).

Als eines der ersten Symptome bei Zinkmangel treten Inappetenz und mangelnde Futtermittelverwertung auf (187, 242). Bei der Ratte beeinflusst Zink direkt das Appetitzentrum; kleinste Zinkgaben können innerhalb weniger Stunden die Freßlust wiederherstellen (201, 202, 242).

Wachstumshemmung ist ein anderes, früh erkennbares Zinkmangelsymptom (201, 214). Sie wird damit erklärt, daß a) nur lebenswichtige Enzymfunktionen erhalten bleiben, b) die Knochenmineralisation gestört ist, c) Zink Wachstumshormone beeinflusst, oder d) die Futtermittelaufnahme wegen Inappetenz gestört ist. (131, 154). Die Veränderungen des Knochensystems sind nicht-entzündlicher Art. Die Differenziation der Knorpel- und Knochezellen verschiebt sich und führt zu einer Bildung von Matrixsubstanz (242). Das Metalloenzym Alkalische Phosphatase findet sich bei Zinkmangel nur noch in gefäßnahen Zellen (124, 334). Bei der enchondralen Ossifikation konnte neben einer "Alkalische Phosphatase"-Zone und einer "Carboanhydrase"-Zone auch eine "Zink"-Zone identifiziert werden (113). Zink wirkt als Katalysator, nicht als Baustein der Knochenentwicklung. (238).

Die Bedeutung des Zinks beim Fortpflanzungsgeschehen ist bekannter (154, 247, 267). Die Prostata von Ratte, Kaninchen und Mensch, die Samenflüssigkeit und die Spermien des Menschen enthalten relativ viel Zink (192). Bei Ratten bessern sich durch Zinkgaben ein gestörter Brunstzyklus und eine Atrophie des Germinalepithels innerhalb von 6 - 8 Wochen (132). Der Zinkgehalt im dorsolateralen Teil der Rattenprostata zeigt sich von Gonadotropin und Testosteron abhängig (27). Zusammen mit Kupfer aktiviert Zink das Gonadotropin FSH (312). Durch Kadmium verursachte Schädigungen des Keimepithels können bei Zinkzulagen zum Futter aufgehoben werden (199).

Der Zinkspiegel ist als diagnostisches Hilfsmittel nur bedingt verwendbar. Bedeutung kommt der Messung des Serumzinkspiegels zu, der beim Zinkmangel der Ratte bis um 38 % fallen kann (132, 199, 201, 220, 297). Der Wert solcher Messungen ist dagegen umstritten in Haar (147, 221, 252), Leber (174), Gesamtblut (220), Knochen (174) und Muskulatur (52, 199). Enzymveränderungen beim Zinkmangel betreffen vor allem die Alkalische Phosphatase von Blut, Knochen, Niere und Dünndarm (124, 238, 247, 197). Erstes Symptom des Zinkmangels überhaupt sei ein Aktivitätsverlust der Pankreas-Carboxypeptidase (201). Betroffen sind weiter die Leber-Lactat-Dehydrogenase (132), die Pankreas-Proteinasen, die Nieren-Glutamat-Dehydrogenase, die Leber-Alkohol-Dehydrogenase (247) und die Pankreas-Amylase (312).

## 8. Zink bei der Entstehung verschiedener Krankheiten

Krankheiten, die mit dem Zinkstoffwechsel in Zusammenhang stehen, sind Tumoren, Atherosklerose, Karies und Diabetes. Sie spielen im Rahmen der Volksgesundheit derzeit eine Rolle. Daß hierbei die Bedeutung von Mineralien und Spurenelementen als Therapeuticum und vielleicht auch als Dia-

gnosticum vernachlässigt wurde, betonen einige neuere Publikationen (124, 183, 240, 285, 323).

Die Cancerogenität von Nickel, Chrom und Arsen ist bekannt. Für Zink bestehen nur widersprüchliche Angaben. Feststeht, daß bei Zinkmangel vermehrt kongenitale Mißbildungen vorkommen; betroffen sind vor allem die schnell wachsenden Gewebe (27, 31, 132, 144, 154, 201, 238, 284, 285, 314). Tumor-Zinkgehalte werden teils als hoch (303), teils als niedrig angegeben (216). In der tumorösen Prostata beobachtet man eine Reduzierung des sonst hohen Zinkwertes (92). In den Zellorganellen von Tumorzellen gleichen sich die Zinkkonzentrationen an (17). Der Blutzinkspiegel ist bei der Krebskrankheit, auffällig beim Bronchialkarzinom subnormal (222). Sowohl niedrige als auch hohe Zinkgaben dämmen das Wachstum von Tumoren ein. Der teratogene Effekt von Kadmium (78) und EDTA (284, 285) wird durch Zink aufgehoben. Vermehrt Magenkarzinome treten auf in Gegenden mit zinkreicher und kupferarmer Gartenerde (154).

Zinkzufuhr zum (vielleicht scheinbar) normal ernährten Organismus verbessert die Wundheilung. Empfohlen werden orale Gaben von 3 mg Zinksulfat pro kg Körpergewicht. Bei Verletzungen wird Zink vermehrt im Harn ausgeschieden, was eine Mangellage verursachen kann (196, 341). Eine Hochzink-Diät bringt beim Wiederkäuer - im Gegensatz zum Menschen - keine zusätzliche Verbesserung des Heilerfolges; beim Zinkmangel beobachtet man jedoch eine deutliche Heilungsverzögerung (176, 199, 240). Der Wirkungsmechanismus ist unklar. Bei heilendem Gewebe konnte eine Aufnahme von <sup>65</sup>Zn beobachtet werden (192, 235). 38 % des Körperzinks befinden sich in der Haut (304).

Eine Ähnlichkeit des Zinkmangelsyndroms mit den Kollagenkrankheiten beschreiben HOEKSTRA (124) und ANDERSON et al.(5). Wegen mangelnder Zelldifferenzierung entsteht ein Übermaß an Grundsubstanz (Hexosamin und Sialinsäure) (242); dies könnte auch die Skelettdeformationen erklären.

Das Metall Zink wird in Zusammenhang mit bestimmten vaskulären Krankheiten erwähnt (Hochdruck, Atherosklerose, Herzinfarkt). Bei Arteriosklerose ist der Zinkgehalt der Aortenwand signifikant erniedrigt; Reihenuntersuchungen des Haar-Zinkgehaltes werden vorgeschlagen (240). Zink vermindert sich im Infarkt-Herzgewebe, und Lactat-Dehydrogenase ist nicht mehr nachweisbar (181, 265). Bei Bluthochdruck wird das Verhältnis Mol Cd/Mol Zn in der Niere größer als 0,35 (265). Blutgefäßkrankheiten gehen mit Änderungen der Zinkverteilung einher (80, 280). Nach SCHROEDER (265) hebt Zink bei der Ratte durch Cd induzierten Hochdruck auf. MASIRONI (181) stellte eine positive Korrelation zwischen Bluthochdruck und Kadmiumgehalt der Luft fest. EDTA senkt den Cholesterinspiegel und steigert die Zinkausscheidung im Harn; es wurde therapeutisch gegen Atherosklerosen eingesetzt (228).

Unter Blutkrankheiten, die mit Zinkmangel verwandt sind, beschreibt KMET (154) eine Anämie mit Hepatosplenomegalie. Bei Zinkvergiftung entsteht dagegen eine Kupfermangelanämie (304). Ungeklärt ist die subnormale Zinkkonzentration der Eosinophilen bei der Leukämie (245). Bei Porphyropathien wird Zink wegen Komplexbildung vermehrt ausgeschieden, was zu einer Mangellage führen kann (238, 321). Ein lokaler Zinkmangel verursacht nach ROMAN (250) typische Störungen; hingewiesen wird z.B. auf Zinkproteine in einem bestimmten Bereich des Hippocampus (188).

Bei postalkoholischer Leberzirrhose sind Plasma- und Leberzink erniedrigt. Wegen Zinkurie entsteht ein konditionaler Zinkmangel (154, 305). Zink fungiert als Aktivator oder ist Bestandteil der Alkohol-Dehydrogenase, dem Enzym der Äthanoloxydation (310).

Ob Zink für die Konfiguration des Insulins in vivo oder für den Diabetes verantwortlich sei, wurde vielfach diskutiert. Zink konnte in den Inselzellen des gesunden Pankreas nachge-

wiesen werden (192, 294), nicht mehr jedoch bei Diabetes (317). Die Zinkwirkung in vivo ist unklar (222); in vitro verhindert es die Insulinwirkung auf Fettgewebe (131).

Am Kwashiorkor und am Krankheitsbild der Protein-Caloric-Malnutrition ist ursächlich vielleicht auch ein Zinkmangel beteiligt (37, 154, 247, 255). OBERLEAS u. PRASAD (214, 238) machen dafür die geringe Verfügbarkeit des Zinks aus Pflanzennahrung verantwortlich. Statt Proteingaben wird für die Bevölkerung in den Entwicklungsländern eine bessere Versorgung mit Zink vorgeschlagen, da Zink bekanntlich die Wertigkeit von Proteinen steigert. Milch sei als Zink- und Proteinquelle gleichermaßen gut geeignet.

Kadmiumvergiftung-Symptome werden durch Zink gemildert (78, 252). Zink wird zu den kariesfördernden Mineralien und Spurenelementen gerechnet (323). Eine Zinkwirkung auf das Nervensystem wurde beobachtet: Hypo- und Dysgeusia sind durch Zinksulfatgaben heilbar (120). Zink beeinflusst nach MILLS et al. (201) direkt das Appetitzentrum.

Es gibt Vorschläge, den Zinkspiegel, als Indikator verschiedener Krankheiten, systematisch zu erfassen. Markante Änderungen der Zinkverteilung werden bei bestimmten Krankheiten beobachtet (26, 183, 240, 323). Zur Diagnose wird die Größe "Zinkspiegel" allerdings selten herangezogen, denn relevante Mittelwerte und Streuungen stehen noch in der Diskussion (221, 230, 247). Beobachtete Veränderungen des Zinkgehaltes von Geweben faßt Abbildung 3 zusammen.

## 9. Toxikologie - Umweltproblem

Zink ist relativ untoxisch für Säuger und Vögel, eine Giftwirkung tritt im allgemeinen erst ab 1000 ppm in der Nahrung ein. Die Pathogenese der Zinkvergiftung wurde an

### Blutzink

|                                              |                      |
|----------------------------------------------|----------------------|
| ↑ Perniziöse Anämie<br>Zn und CA stark↑(305) | ↓ Anämie; EDTA (305) |
|----------------------------------------------|----------------------|

### Erythrozyten-Zink

|                                                     |                                                                                                            |
|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ↑ Perniziöse Anämie,<br>obwohl Hämatokrit↑(305,312) | (normal bei Zinkmangel)<br>Zn u. CA des Msch. bei der Geburt 25 %; Normalwert mit 10 Jahren erreicht (305) |
|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

### Leukozyten-Zink

|                            |                  |
|----------------------------|------------------|
| ↑ Anämie, Leukopenie (312) | ↓ Leukämie (312) |
|----------------------------|------------------|

### Serumzink

|                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ↑ Stress (323)<br>Tumor zinkreicher Org.(305)<br>Virushepatitis (341)<br>Porphyria cutanea (250)<br>akute intermittierende<br>Porphyrie: sehr ↑(250) | Körpertemp. Erhöhung↑60-80ug% (341)<br>Zinkmangel (247), Leukämie, Anämie<br>Pern.Anämie ↑80-90ug% (341)<br>Akuter Myokardinfarkt (222, 312)<br>Akute u. chron. Infektionen (222)<br>Bronchitis, Pneumonie (312)<br>Chron. Glomerulonephritis (341)<br>Psoriasis, Geschwüre (91), Erysipel<br>Tumor (312), Bronchialkarzinom(222)<br>Leberzirrhose (122, 250, 341)<br>Kwashiorkor, PCM (122, 305, 312)<br>↓ Schwangerschaft (22, 222) |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

### Leberzink

|                                                         |                                                                                                                 |
|---------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ↑ Zinkvergiftung (252,305)<br>↓ Kadmiumvergiftung (198) | Zinkmangel; immer wenn LDH ↑(247)<br>Leber- und Nierenkrankheiten, (226)<br>↓ auch Nierenzink↓, Herzzink normal |
|---------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

### Knochenzink

|                           |                                                  |
|---------------------------|--------------------------------------------------|
| ↑ Kadmiumvergiftung (198) | Zinkmangel (198)<br>↓ Coccidiostaticum DOT (147) |
|---------------------------|--------------------------------------------------|

### Harnzink

|                                                                                                                                                                                                                                                                       |  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| ↑ Nephrose, Albuminurie<br>Postalkohol.Leberzirrhose<br>Bluthochdruck (305)<br>Leberporphyrie, maximal<br>bei akuter intermitt.(250)<br>Verwundung (196)<br>Rheumatische Arthritis (33)<br>Periarteriitis nodosa:<br>sehr (250)<br>EDTA (228, 250)<br>Hungerkur (276) |  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

### Kotzink

|                                           |                    |
|-------------------------------------------|--------------------|
| ↑ Kadmiumvergiftung (198)<br>↓ EDTA (228) | ↓ Zinkmangel (198) |
|-------------------------------------------|--------------------|

### Haarzink

|  |                                                                                                     |
|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | ↓ Zinkmangel, in 4 Wochen auf<br>50-60 %; wegen Schwankungsbreite<br>als Indikator ungeeignet (221) |
|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|

Abbildung 5: Zinkspiegel als Indikator; ↑ ist gleichbedeutend mit einer Erhöhung, ↓ mit einer Erniedrigung des ursprünglichen Zinkgehaltes

der Ratte untersucht (261, 304). Nach anfänglichem Wachstumsstillstand und Appetitmangel kommt es zur Ausbildung einer mikrozytären und hypochromen Anämie (Kupfermangelanämie), wobei das Leberzink stark erhöht ist, während Kupfer und Eisen, sowie Ferritin, Cytochromoxydase und Katalase der Leber erniedrigt sind (27). Das im Überschuß aufgenommene Zink führt zu Kupfermangel (50, 252). Knochenentwicklung und -mineralisation sind gestört, eventuell als Folge der verminderten Phosphor-Resorption. Auch ein lipotroper Effekt ist beobachtbar. Zink besetzt in Enzymen freie Thiolgruppen (27). Die Bildung von Zink-Aminosäure-Komplexen führt zu Hyperglycämie, da eine Wirkung kontra Insulin eintritt.

Gelegentlich findet Zink, neben den Schwermetallen, Erwähnung als Umweltgift (297). Mit der Nahrung nimmt der erwachsene Mensch normal täglich 10 - 15 mg Zink(II) auf. Der Tagesbedarf von Kindern liegt bei 7 mg. Akute toxische Wirkungen treten ab Mengen von etwa 150 mg Zink auf (27). Der Gesamtzinkgehalt des menschlichen Körpers beträgt etwa 2 - 4 g.

Zink kann in Organismen angereichert werden. Das Moos *Hypnum cypressiforme* dient wegen seiner Bereitschaft, Zink zu speichern, als Indikator einer Luftverschmutzung mit Zn, sowie Cd und Pb. Hohe Zinkkonzentrationen werden vor allem in bestimmten Pflanzen, der sogenannten Galmeiflora gemessen. Zink akkumuliert in Meerestieren (254), z.B. in Austern. Krabbe und Hummer halten das Gewebezink konstant gegen ein Konzentrationsgefälle (43). Höhere Tiere vermögen im Überschuß aufgenommenes Zink nicht sogleich wieder abzugeben. Zink ist ein Konzentrationsgift; die Bindung ist reversibel. Die Zinkkonzentration in der Leber des Rindes beträgt normalerweise 20 - 150 ppm in der TS, verdächtig sind 250 ppm, als hochverdächtig für eine Intoxikation werden Zinkgehalte von 500 ppm angesehen (252).

## II. Bedeutung des Zinks im Muskelfleische

Zink erreicht im Fleisch mit 30 mg/kg die Konzentration eines Mengenelementes (27). Über seine Bedeutung in der Muskelphysiologie, sowie bei der Fleischentstehung und -verarbeitung ist wenig bekannt. Nach HAMM (98) bedürfen vor allem die Bindung des Zinks (Beziehung zur Proteinkonformation) und seine Funktion im Muskel (Enzymaktivierung, Kontraktionsmodell), sowie die Wirkung auf die Hydratation und den postmortalen pH-Verlauf im Fleisch der Untersuchung.

Zink ist sicher an den biochemischen Prozessen beteiligt, die aus Tiermuskeln das Nahrungsmittel Fleisch entstehen lassen.

### 1. Zinkkonzentration im Muskel

Der Muskel enthält je nach Funktion unterschiedliche typische Konzentrationen an Zink. Langsam kontrahierende, ausdauernd belastbare Muskeln enthalten mehr Zink als schnell kontrahierende (24, 53, 286). Dies trifft auch für die Crustaceen-Muskulatur zu (43). Trainierter Muskel weist mehr Zink auf als untrainierter (27). CASSENS et al. (53) unterscheiden hinsichtlich des Zinkgehaltes drei Gruppen von Muskeln: 1) M.serratus vent., trapezius und rectus abdominis oder sogenannte high-zinc-muscles. Sie sind dunkel gefärbt und trocken nach Ablösung vom Knochen und wirken als Tonusmuskeln. 2) M.latissimus dorsi und semitendineus zeigen mittleren Zinkgehalt. 3) Zinkarm sind M.longissimus dorsi und semimembranaceus. Sie sind von heller Farbe und PSE-gefährdet. Der M.psoas ist zwar ein zinkarmer, aber dunkel gefärbter Muskel.

Zinkmangel und -überschuß (bis 633 ppm im Futter) verändern weder die charakteristischen Zinkwerte der Muskulatur noch die Zink-65-Verteilung. Sie verursachen aber markante

Tabelle 7: Gehalte an Zink in der Muskulatur

| Probe              | µg Zn/g    | µg Zn/g TS       | Weitere Angaben | Lit./Jahr |
|--------------------|------------|------------------|-----------------|-----------|
| <u>Rind</u>        |            |                  |                 |           |
| Long.dorsi         | 46         | -                |                 | 24/61     |
| Semimembranaceus   | 38         | -                |                 | "         |
| Serratus ventralis | 65         | -                |                 | "         |
| Rectus abdominis   | 56         | -                |                 | "         |
| Semitendineus      | 36         | -                |                 | "         |
| Trapezius          | 50         | -                |                 | "         |
| Longissimus dorsi  | 36         | -                |                 | 286/59    |
| Psoas              | 21         | -                |                 | "         |
| Semimembranaceus   | 37         | -                |                 | "         |
| Serratus ventralis | 74         | -                |                 | "         |
| Rectus abdominis   | 57         | -                |                 | "         |
| Semitendineus      | 28         | -                |                 | "         |
| Latissimus dorsi   | 47         | -                |                 | "         |
| Trapezius          | 36         | -                |                 | "         |
| Longissimus dorsi  | 38; 36; 40 | -                |                 | 23/60     |
| "                  | 77,9±30,1  | -                |                 | 117/73    |
| "                  | -          | 31,7             |                 | 98/58     |
|                    |            |                  | 0,5mM Zn/kg     | "         |
|                    |            |                  | 10,0mM Mg/kg    |           |
|                    |            |                  | 1,0mM Ca/kg     |           |
|                    |            |                  | 0,6mM Fe/kg     |           |
| Herzmuskel         | 12,8-17,2  | -                |                 | 332/65    |
| <u>Kalb</u>        |            |                  |                 |           |
| Semitendineus      | -          | 86               |                 | 198/68    |
| Longissimus dorsi  | 33,0±16,8  | 96,4±50,2        |                 | 117/73    |
| Herzmuskel         | 19,2-23,3  | -                |                 | 332/65    |
| "                  | -          | 74,8             |                 | 198/68    |
| <u>Schwein</u>     |            |                  |                 |           |
| Longissimus dorsi  | -          | 69               |                 | 53/63     |
| Trapezius          | -          | 230              |                 | "         |
| Serratus ventralis | -          | 247              |                 | "         |
| Rectus abdominis   | -          | 217              |                 | "         |
| Psoas              | -          | 87               |                 | "         |
| Longissimus dorsi  | -          | 75; 62; 69       |                 | 52/63     |
| "                  | 22,4±1,8   | 91,2±7,3         |                 | 117/73    |
| Trapezius          | -          | 186; 188;<br>173 |                 | 117/73    |
|                    |            |                  | allgemein       |           |
|                    |            |                  | 0,53-0,70       |           |
|                    |            |                  | mg Zn/g N       | 42/61     |
| <u>Geflügel</u>    |            |                  |                 |           |
| Extremitäten-Musk. | 8,3        | -                |                 | 141/72    |
| Brust-Muskulatur   | 3,1        | -                |                 | "         |
| <u>Mensch</u>      |            |                  |                 |           |
| Skelettmuskel      | -          | 226              |                 | 71/40     |
| Herzmuskel         | -          | 100              |                 | "         |

Änderungen im Fett- und Wassergehalt (53, 193, 199). Die Homeostase deutet auf eine konstante Zahl zinkbindender Stellen hin (193, 195, 199, 304). Nach CASSENS et al. (52, 53) verändert auch die Behandlung der Tiere vor dem Schlachten, z.B. durch Bewegen oder vermehrte Zinkgaben im Futter, den Zink- und Myoglobingehalt der Muskulatur nicht. Eine Extrapolation der Zinkkonzentration von einer einzelnen Muskelprobe auf die Gesamtmuskulatur ist deshalb unzulässig (53). Zinkwerte, unterteilt nach Tierarten und Muskelgruppen, sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Der Turnover von Zink beträgt nach MCKENNEY (187) 2 % pro Tag. Die Muskulatur stellt jedoch keinen Zinkspeicher dar; es ist in Mechanismen eingebaut (304). Zink-65 akkumuliert bei einmaliger Applikation bis zu 70 Tage im Muskel (57, 137, 169, 199). Nach MILLER et al. besitzt die Muskulatur eine konstante Zahl zinkbindender Stellen (199).

Zur Lokalisation von Mineralien in der Muskelfaser wurden verschiedene Methoden entwickelt. Bei UV-Spektrometrie findet man die meisten Mineralien in der H-Scheibe. ATP liegt an den I-Banden (93). SCOTT (269) fand bei Spodographie mit dem Elektronenstrahl vermehrt Asche in der A-Bande und der Z-Linie. Mit der gleichen Methode ermittelten DRAPER u. HODGE (63) periodische Anhäufungen von Asche auf den Myofibrillen. Wegen der Veraschungstemperatur von 700°C wurden jedoch nur Fe, Ca, Mg und P erfaßt. Scott verwendete nicht-fixiertes Material, weshalb man annehmen muß, daß die Z-Bande vorwiegend K, Na und Chloride enthält. HASSELBACH (112) stellte bei fraktionierter Extraktion der Muskelproteine fest, daß Erdalkalien zum größten Teil an Actin gebunden sind. Eine Vorstellung der Mineralverteilung nach Untersuchungen von HAMM (98) bringt die Tabelle 8. (Seite 28).

## 2. Metabolisierung der Muskelkationen

Die Biokomplexe des Zinks sind viel weniger erforscht als

Tabelle 8: Die molare Verteilung von Mg, Ca, Zn und Fe auf die verschiedenen Bindungsarten im Rindermuskel, 5 Tage post mortem, nach HAMM (98)

| 100 g Muskel<br>enthalten | davon sind gebunden an    |                                 |                                             |                                  |
|---------------------------|---------------------------|---------------------------------|---------------------------------------------|----------------------------------|
|                           | strukturierte<br>Substanz | wasser-<br>lösliche<br>Proteine | wasserlösl.<br>niedermoleku-<br>lare Subst. | ionisiert<br>oder sehr<br>locker |
| uMol                      | uMol                      | uMol                            | uMol                                        | uMol                             |
| <u>Bei ph 5,5</u>         |                           |                                 |                                             |                                  |
| 1000 Mg                   | 110                       | 20                              | 0                                           | 870                              |
| 100 Ca                    | 60                        | 3                               | 4                                           | 33                               |
| 50 Zn                     | 32                        | 12                              | 0,5                                         | 6                                |
| 60 Fe                     | 17                        | 39                              | 4                                           | 0                                |
| <u>Bei ph 7,0</u>         |                           |                                 |                                             |                                  |
| 1000 Mg                   | 310                       | 60                              | 40                                          | 590                              |
| 100 Ca                    | 80                        | 7                               | 12                                          | 1                                |
| 50 Zn                     | 33                        | 14                              | 2                                           | 1                                |
| 60 Fe                     | 18                        | 36                              | 6                                           | 0                                |

die des Eisens, da Zink keine unpaaren Elektronen besitzt, keine paramagnetische Resonanz zeigt und farblose Komplexe bildet (308). VALLEE (325) erwähnt Zink als übersehenen "organizer" der Reaktion von Apoenzym und Coenzym mit dem Substrat. In den letzten Jahren konnten mehr als 15 Zinkproteide nachgewiesen werden, die teilweise Enzymfunktion haben. Sie kommen in allen Phyla vor. Dabei kann ein und dasselbe Enzym je nach Tierart oder Gewebe Zink enthalten oder nicht; ein Beispiel dafür ist Aldolase, die in E.coli und Hefen Zink enthält, nicht aber in menschlicher Leber (222, 324).

### 1. Bindungsstärke der Muskelkationen

Für die Bindungsstärke zweiwertiger Metallionen an Komplexbildner läßt sich die Reihenfolge Ca Mg Mn Fe Co Ni Cu Zn aufstellen (176), was in Abbildung 6 schematisch dargestellt ist.

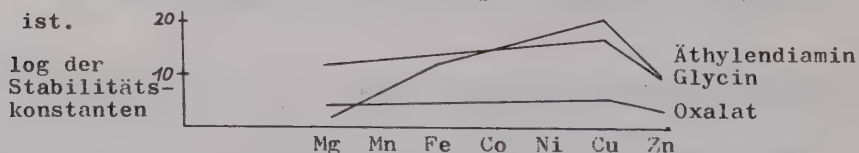


Abbildung 6: Stabilität zweiwertiger Komplexe von Äthylenamin, Glycin und Oxalat (176, 308, 337)

Ein Maß für die Stärke der Bindung ist die Reaktionsgeschwindigkeit des Kationenaustausches im Gewebehomogenat. HAMM (98) stellte folgende Bindungsfestigkeit für Kationen an Muskelhomogenat fest:  $Mg < Ca = Zn < Fe$ . Sie erweisen sich bei pH 7,0 bedeutend fester gebunden als bei pH 5,5. 30 % des Magnesiums und 85 - 99 % des Calciums und Zinks sind bei pH 7,0 fest an Strukturproteine gebunden. HAMM (98) beschreibt drei Bindungsarten der Erdalkalien an die Muskelproteine: 1) feste Bindung, 2) Ionenpaarbindung im Sinne von Bjerrum und 3) Ionenatmosphäre nach Debye und Hückel. An anderer Stelle unterscheidet HAMM (102) zwischen 1) sehr fester Bindung, auch bei niedrigem pH (Käfigverbindung, Cheltrat), 2) pH-abhängiger Bindung, die bei pH 7,0 relativ fest ist (Chelat) und 3) elektrostatischer Bindung, wo Ionen leicht austauschbar sind.

MÜHLRAD et al. (205) wiesen für Ca zwei Bindungsarten nach: eine lockere, leicht austauschbare, und eine "feste" Bindung. KLOTZ (152) betont vor allem die Bedeutung der elektrostatischen Bindung. Die Bindungsstärke wird nach WILLIAMS (337) maßgeblich bestimmt von der Größe des Metalles, seiner Elektronegativität und sterischen Faktoren der Liganden.

Als Kriterium der Bindungsfestigkeit eignet sich Wasserextraktion nur unvollkommen, da Ionen auch an extrahierte Proteine gebunden sind (98). Besser werden die Aktivitäten der Ionen im Extrakt mit Ionenaustauschern oder durch Ultrafiltration bestimmt. Erhältlich sind allerdings immer nur relative Werte der Bindungsstärke (98).

## 2. Bedingungen der Metallbindung

Allgemein gilt, daß die Stabilität von Chelonen mit steigendem pH und fallender Temperatur wächst (27). Bei pH-Senkung entladen metallbindende Proteingruppen, was zu einer Lockerung der Mg-, Ca- und Zn-Bindung führt, nicht jedoch der Eisenbindung (39, 98, 152, 246). Aus der pH-Metallbindungskurve folgte EDMAN (68), daß hauptsächlich Imidazolgruppen mit einem  $pK$  von 6,7 an der Zinkbindung beteiligt

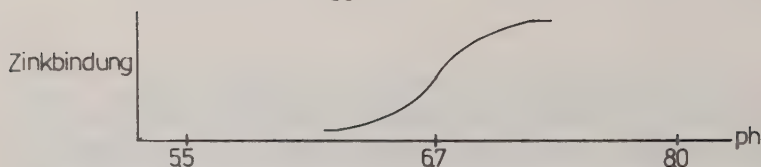


Abbildung 7: Zinkbindung in Abhängigkeit vom ph (68)

seien. ARNOLD et al. (10) fanden, daß beim Erhitzen von Fleisch K, Mg und Ca freigesetzt werden. Auf diese Weise könne das WBV trotz der Denaturierung der Proteine aufrechterhalten werden. Die stufenweise Freisetzung von Ca und Mg beim Erhitzen von Fleisch erfolgt nach HAMM (101) in gleichem Maße, in dem durch Denaturierung die Zahl der sauren Gruppen abnimmt. Zink wird dabei ebenfalls freigesetzt, wie in Tabelle 9 dargestellt ist.

Tabelle 9: Freisetzung von Zink beim Erhitzen von Fleisch (101)

| Erhitzungs-<br>temperatur | μMol gebundenes Kation |     |         |
|---------------------------|------------------------|-----|---------|
|                           | Mg                     | Ca  | Zn      |
| 20°C                      | 6,2                    | 3,9 | 1,8±0,2 |
| 90°C                      | 1,0                    | 1,1 | 1,5±0,1 |

HAMM (102) untersuchte die Dissoziation von Metallkomplexen im postmortalen Muskel. Der schlachtfrische Muskel enthält nur wenig oder überhaupt kein dissoziiertes Ca und Zn, dagegen 60 % dissoziiertes Mg. Innerhalb von 48 Std. p.m. geht jeweils ein Teil des Ca, Mg und Zn in den dissoziierten Zustand über; nach weiteren 5 Tagen nimmt allerdings nur noch die Dissoziation des Ca zu. Der Zinkgehalt der strukturellen Proteine ändert sich p.m. nicht signifikant, weshalb das im Rigor freigesetzte Zink aus wasserlöslichen Strukturen abgespalten sein muß (102). Der postmortale Verlauf der Zinkbindung ist in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Änderung der Zinkbindung im Rindermuskel p.m. (102)

| 100 g<br>Muskel<br>enthalten | Davon liegen vor                 |      |      |                                                        |      |      |
|------------------------------|----------------------------------|------|------|--------------------------------------------------------|------|------|
|                              | DISSOZIIERT NACH<br>LAGERUNG VON |      |      | GEBUNDEN AN STRUKTURELLE<br>PROTEINE NACH LAGERUNG VON |      |      |
|                              | 2 h                              | 48 h | 7 d  | 2 h                                                    | 48 h | 7 d  |
| μMol                         | μMol                             | μMol | μMol | μMol                                                   | μMol | μMol |
| Zink                         |                                  |      |      |                                                        |      |      |
| 44±1                         | 1,1                              | 5,1  | 4,9  | 29,8                                                   | 29,0 | 30,2 |

ATP ist im frischen Muskel über zweiwertige Ionen an Myosin gebunden. Als Folge des ATP-Abbaues p.m. gehen die Metalle andere Bindungen ein (Rigortheorie nach HAMM) (106): aus Myosin-Mg-ATP wird Myosin-Mg-Actin.

Neutralsalze beeinflussen die Mineralbindung. Zusätze von 2 - 10 % NaCl zu Fleischbrei reduzieren die Bindungsstärken von Ca, Mg und Zn (7). Der Effekt von NaCl auf die Verteilung des Zinkions im Rindermuskel ist aus der folgenden Tabelle 11 ersichtlich.

Tabelle 11: Verteilung des Zinks im Rindermuskel bei NaCl-zusätzen (7)

| Zugefügtes NaCl in % | Totales Zn in mg/100g Probe A | Zn in mg/100g Probe B | Gebundenes Zn in mg/100g Probe A | Zn in mg/100g Probe B |
|----------------------|-------------------------------|-----------------------|----------------------------------|-----------------------|
| 0                    | 4,73                          | 5,15                  | 3,85                             | 4,54                  |
| 2                    | 4,73                          | 5,15                  | 3,70                             | 4,48                  |
| 5                    | 4,73                          | 5,15                  | 3,62                             | 4,40                  |
| 10                   | 4,73                          | 5,15                  | 3,60                             | 4,37                  |

### 3. Chemie der Zinkbindung

Durch Kombination von vier Hybridorbitalen des Zinkions ( $sp^3$ ) mit vier geeigneten Orbitalen des oder der Liganden werden Sigma-Bindungen gebildet (27). Die Koordinationszahl von Zn ist 4 oder 6. Viererkomplexe (mit Ammoniak, Chlor oder der Thiolgruppe) sind eher ionisch, Sechserkomplexe (Hydrat) mehr kovalent (324, 337). Die Geometrie der entstehenden Metall-Protein-Komplexe ist oft unregelmäßig ("Kompromiß-geometrie"): Sechs Schwefelliganden passen nicht um ein Übergangsmetall wie Zink, vier Liganden jedoch sehr gut. Sie bestimmen die Richtung der Polarisierung der Zinkorbitale ( $sp^3$ -hybrids) (337). Zink bildet nach WALLENFELS (320) leichter ebene als tetraedrische Komplexe. Nach der allgemeinen Koordinationschemie geht Zink Bindungen vor allem mit S-, C- und N-Liganden ein, weniger mit O-Liganden (337).

### 4. Funktionen der Metallbindung

Metalle sind Pfeiler der Proteinkonformation. Entfernen zweiwertiger Kationen mit Pyrophosphat oder EDTA bringt Fibrillen zum Schwellen und zu leichter Kontraktion (36).

Chelatbildung bedingt in biologischen Systemen gleichbleibende Metallkonzentrationen (72). Die Serumproteine stellen Chelate mit Transportfunktion dar. Nach WILLIAMS (337) ist Zink in Enzymen für die Substratbindung zureichend. Ohne selbst einen Valenzwechsel zu erfahren, kann Zink durch Verlagerung von Elektronen Redoxvorgänge an benachbarten Gruppen auslösen (211). WALLENFELS (320) entwarf Modelle der Enzymwirkung mit dem Zinkion als Angelpunkt. Zink vermittelt auch die Bindung kleinerer Moleküle an Proteine (152).

Zweiwertige Metalle sind an Actomyosin so fest gebunden, daß sie als funktionelle Gruppen dieses Proteins betrachtet werden können (34, 36, 87, 112, 322). Weder starke Komplexbildner (36, 112), noch Kationenaustauscher (98) vermögen sie vollständig aus dem Eiweiß zu entfernen. Möglicherweise bestehen die Brücken zwischen Actin und Myosin aus Erdalkalimetallen: In der Überlappungszone von Actin- und Myosinfilamenten (A-Bande) ist jedenfalls das Ca-Bindungsvermögen besonders stark ausgeprägt (16, 251, 339).

## 5. Ankergruppen für Metalle

Unter den Aminosäuren besitzt neben Cystein vor allem Histidin ein hohes Bindungsvermögen für Zink. Es ist durch den stark zinkaffinen Imidazolkern des Histidins bedingt (68, 72, 127, 211, 326, 320, 333). Das im Rindermuskel vorhandene

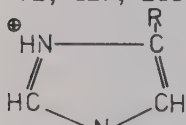


Abbildung 8:  
Imidazolkern

Histidin - 3 g/100 g Protein - würde allein für die Bindung des Muskelzinks ausreichen (98). Für einige Peptide und Proteine, wie Insulin und Carnosin, kann schon auf Grund ihrer Aminosäuresequenz die Lokalisation des Zinks bestimmt werden (326). WEITZEL u.

FRETZDORFF (325) geben eine Aufstellung der Zink-Imidazol-Verbindungen, die bei physiologischem pH möglich sind: Verbindungen mit Imidazol als Anion, z.B. im Zink-Imidazol<sub>2</sub>. Imidazol fungiert dabei als Anion einer schwachen Säure, da seine Iminogruppe ein Proton abgeben kann. Weiter werden Verbindungen mit Imidazol als Kation bzw. als ungeladenem Molekül aufgeführt. Für die Zinkbindung an die Imidazolgruppen

von Bioliganden kommen in Betracht (325): 1) Koordinative Bindung mit Hilfe des Pyridin-N; dem Zn ist hier die Koordinationszahl 4 unter Ausbildung zweier heteropolarer und zweier koordinativer Bindungen zuzuschreiben. 2) Salzbildung mit Hilfe des Pyrol-N nach Abspaltung eines Protons und 3) gleichzeitig koordinative und heteropolare Bindung mit Hilfe beider N-Atome, z.B. in Zink-Imidazol<sub>2</sub>.

Die Bindung des Zinks erfolgt optimal beim pH 6,3, was dem pK der Imidazogruppe entspricht (18, 68, 89, 98, 324, 325, 326). Von biologischem Interesse ist die Gruppierung "R<sub>1</sub> - Imidazol - Zn - Imidazol - R<sub>2</sub>", weil durch sie Ketten von Makromolekülen verknüpft werden (325).

Die hohe Stabilität des Zink-Cysteins (1:2) deutet auf eine große Beteiligung von Sulfhydrylgruppen an der Zinkbindung (27, 68, 72). Endogene Thiole (Alkohole,

bei denen -OH durch -SH ersetzt ist), als einfachstes H<sub>2</sub>S, beeinflussen nämlich wegen ihrer starken Affinität zu Metallen



Abb. 9: Thiolgruppe

den Stoffwechsel erheblich (11, 27, 101, 143, 333). Während der Fleischlagerung nimmt die Zahl der Sulfhydrylgruppen ab, wodurch es zu einer Freisetzung zweiwertiger Ionen kommt (141). Nach WILLIAMS (337) fungiert die Thiolgruppe als Ligand für Zink in Dehydrogenasen (Cd wirkt als kompetitiver Antagonist), die Konfiguration  $R < \begin{smallmatrix} S^- \\ NH_2 \end{smallmatrix}$  in Carboxypeptidase für Zn und auch noch für Co, Ni und Mn bei erhaltener Enzymaktivität und die Gruppe  $R < \begin{smallmatrix} S^- \\ S \end{smallmatrix}$  in Nierenproteinen für Zn und Cd.

Funktionelle Gruppen der Zinkbindung sind Aminogruppen (56, 72, 101, 111, 152, 337). Als Ligand für Zn und die meisten anderen Schwermetalle dient auch die Phosphatgruppe (337). Phenolgruppen, z.B. in Adrenalin (27) und Tyrosin (92) vermögen Metalle ebenfalls zu binden. In Glutamin- und Asparaginsäure wirken die Carboxylgruppen als Bio-Kationenaustauscher (27, 56, 72, 101, 152). Sie sind, außer für Zn, auch Bioliganden für Mg, Ca und Mn (337). Bei pH-Werten >7,0, maximal ab pH 8,29, verbindet sich Zn unter Aufgabe der

Proteinbindung mit Hydroxylgruppen (72, 152).

## 6. Moleküle der Metallbindung, Zinkproteide

Künstliche Komplexbildner sind Acetylsalicylsäure, EDTA, Penicillamin, Isoniazid, BAL (Propandithiol), Hydralazin, Diphenyldithiocarbazon (Dithizon), Carbamate, Zincon, Neomycin, Alloxan, Dithiooxamide, 8-Hydroxychinolin (27, 155). Die Hydroxycarbonsäuren Milchsäure, Zitronensäure, Bernsteinsäure und Äpfelsäure bilden Metallkomplexe, deren Stabilität in der Reihenfolge Cu Ni Co Zn Cd sinkt (27). Aromatische Hydroxycarbonsäuren entfalten ihre Wirkung möglicherweise aufgrund ihrer metallbindenden Eigenschaften (124, 228). Zweiwertige Kationen verändern die Reaktionsfähigkeit von Ketocarbonsäuren, z.B. der Brenztraubensäure, über eine Enolisierung der  $\alpha$ -Carbonylgruppe (27).

Die Stabilität von Aminosäure-Komplexen mit Metallen nimmt in der Reihenfolge Cu Ni Zn Pb Co Cd Fe Mn Mg ab (152, 324). Biologisches Interesse beanspruchen vor allem die Aminosäuren Histidin und Cystein, deren Zinkkomplexe durch Wasser nicht hydrolysiert werden: Zink-Histidin (1:2) und Zink-Cystein (1:2) gehören zu den wichtigsten zellvertrauten zinkbindenden Metallkonfigurationen (324). Art und Stabilitätskonstanten von Zinkkomplexen sind in der Abb.10 angegeben.

|             |        |       |
|-------------|--------|-------|
| Essigsäure  | 1      | (176) |
| Histidin    | 6,6    | (176) |
|             | 12,0   | (324) |
| Glycocoll   | 5,5    | (320) |
| Glycin      | 5,5    | (176) |
| Aminosäuren | 7 - 10 | (324) |
| Cystein     | 9,9    | (176) |
|             | 17,0   | (324) |
|             | 18,2   | (212) |
| EDTA        | 16,5   | (212) |

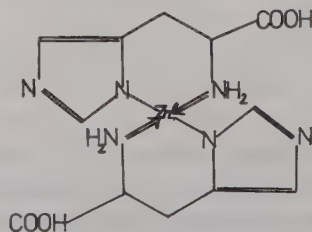


Abbildung 10: Logarithmen der Stabilitätskonstanten von Zinkkomplexen und Reaktion des Zinks mit Histidin in der Formel (324, 328).

Beim Cystein treten Amino-N und das Schwefelatom in Metallbindungen ein, jedoch nicht die Carboxylgruppe (68, 324). Cystein beugt nach HOEKSTRA et al. (124, 212) der Zinkmangel-

krankheit vor, weil es als Komplexbildner die Verfügbarkeit des Zinks erhöht. Den Cysteingehalt von Myosin und Actin gibt WEITZEL (324) mit 0,8 - 0,9 % an. Möglichkeiten einer Komplexbildung von Zn mit Cystein sind in der folgenden Abb. 11 aufgezeichnet.

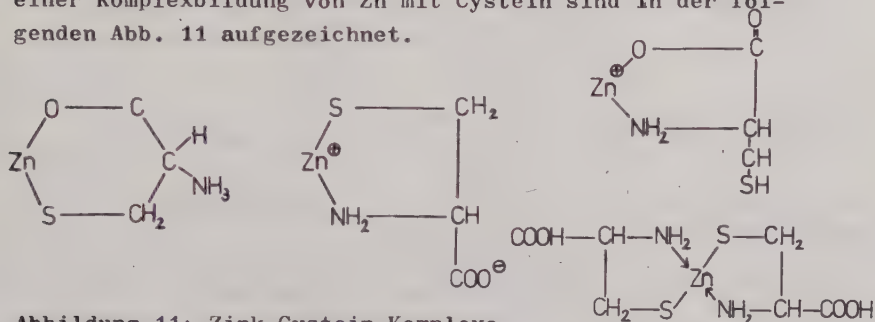


Abbildung 11: Zink-Cystein-Komplexe

Als weitere Komplexbildner werden Glycocoll (176), Lysin, Arginin (27, 152) und Tryptophan (124) genannt.

Das Metallbindungsvermögen der Peptide resultiert aus den an ihrem Aufbau beteiligten Aminosäuren. Es ist aber weniger ausgeprägt als das der einzelnen Aminosäuren (227, 324). Eine Beteiligung der Peptidgruppe an der Zinkbindung ist bisher nicht nachgewiesen worden, wohl aber für Cu und Co (251). Möglicherweise bindet Glutathion über seine SH-Gruppe Metalle und wahrscheinlich auch Zink (27, 178). In Carnosin und Anserin erfolgt die Bindung über eine Imidazolgruppe (178).

Zink wird in Proteinen, speziell in Enzymen, mit der "active catalytic site" in Zusammenhang gebracht. Zn wirkt als Stabilisator der Struktur und als Bindeglied zwischen Apoenzym, Coenzym und Substrat. Eingehende Untersuchungen liegen für Alkohol-DH und Carboxypeptidase vor (313). An Beziehungen von Übergangsmetallen zu Proteinen werden diskutiert (328): 1) eine Stabilisierung der Tertiärstruktur, 2) eine Metallbrückenbildung zwischen Enzym oder Hormon und Substrat, wobei Zwischenkomplexe die Reaktion beschleunigen, 3) eine Wirkung direkt als Cofaktor oder Coenzym bei Redoxreaktionen und 4) die Funktion der Metallproteide als Metallspeicher und -träger. Je nach Stabilitätskonstante unter-

scheidet man, wie Tabelle 12 näher ausführt, Metalloenzyme und Metallenzymkomplexe (308).

Tabelle 12: Unterscheidung von Metalloenzymen und Metallenzymkomplexen

|                                       | Metalloenzym                                             | Metallenzymkomplex                           |
|---------------------------------------|----------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Bindung                               | fest                                                     | lose                                         |
| Reinigen und Dialyse Metall/Aktivität | Metall erhalten steigt bei Proteinisolierung             | Metall verloren fällt bei Proteinisolierung  |
| Zahl der Metallatome                  | definiert                                                | nicht bestimmt                               |
| Art des Metalles                      | der 1. und 2. Übergangsgruppe, nur ein bestimmtes Metall | sämtliche Metalle untereinander austauschbar |

Fraglich bleibt, ob aus dem Zinkgehalt in Gewebeschnitten auf den Zinkenzymgehalt geschlossen werden kann. 3,5 % des Zinks sind in der Prostata an Carboanhydrase gebunden. In der Leber beträgt der Anteil enzymatisch gebundenen Zinks maximal 1 %, in der Darmmucosa bis zu 5 % (247). BERSIN (27) berichtet über eine calciumähnliche Schutzwirkung des Zinks auf bestimmte Proteine; die  $\alpha$ -Amylase z.B. wird von Proteasen nicht angegriffen, wenn sie Zn enthält. Angaben über die Bindung des Zn an Proteine und Enzyme sind in Tabelle 13 zusammengestellt. Die nächste Tabelle 14 gibt Auskunft über Metallenzymkomplexe, die wahrscheinlich durch Zink aktiviert werden.

Carboanhydrase enthält nach KEILIN u. MANN (138) 0,33 % Zink. Dieses Ferment regelt die Säure-Base-Homeostase. Der Zinkgehalt menschlicher Ery korreliert mit CA. Ein Austausch des Zn gegen andere Kationen führt zu Aktivitätsverlust (9, 308, 312). Das Zinkion wird in der CA in tetraedrischer Anordnung von drei Histidin-N und einem  $H_2O$ -Molekül gebunden (39, 148). VALLEE u. WACKER (311) entdeckten 1956, daß auch Laktat-DH des Kaninchenmuskels Zn enthält. Sie katalysiert die Reaktion  $Pyruvat + NADH + H^+ \rightleftharpoons NAD^+ + Lactat$ . VALLEE (309) wies auch nach, daß Glutamat-DH in Rinderleber Zn enthält. Die GDH katalysiert die Reaktion  $\alpha\text{-Keto-Glutarat} + NADH + NH_4^+ \rightleftharpoons NAD^+ + H_2O + Glutamat$ .

Tabelle 13: Angaben über die Bindung des Zinks an Enzyme

| Protein                     | Co-faktor | MG      | gAtom /Mol | Quelle                         | Literatur                |
|-----------------------------|-----------|---------|------------|--------------------------------|--------------------------|
| Carboanhydrase              | -         | 30.000  | 1          | Ery, Rind                      | 9,39,138,222, 308, 266   |
| "                           | -         | 28.000  | 1          | Ery, Mensch                    | 222,331                  |
| "                           | -         | 29.000  | 1          | Ery, Macaca m.                 | 222,331                  |
| Carboxy-peptidase A         | -         | 34.300  | 1          | Pankreas, Rind                 | 176,201,204, 307,312,313 |
| " B                         | -         | 34.300  | 1          | Pankreas, Schwein              | 222                      |
| Dipeptidase                 | -         | 47.200  | 1          | Niere, Hund                    | 49                       |
| Alkohol-DH                  | NAD       | 150.000 | 4          | Leber, Pferd                   | 247,331,65               |
| "                           | NAD       | ?       | >2         | Leber, Mensch                  | 222                      |
| "                           | ?         | ?       | ?          | Hefe                           | 308,310,313              |
| Glutamat-DH                 | NAD       | 1 Mio   | 2-6        | Leber, Rind                    | 18,20,309                |
| "                           | NAD       | ?       | ?          | Herzmuskel, Rind               | 32,331                   |
| Glyceraldehyd-3-Phosphat-DH | NAD       | 137.000 | 2-3        | Skelettmuskel, Schwein u. Rind | 222                      |
| Lactat-DH                   | NAD       | ?       | ?          | Muskel, Kaninchen              | 311,312                  |
|                             |           |         |            | Herzmuskel, Rind               | 304                      |
| Malat-DH                    | NAD       | 40.000  | 1          | Herzmuskel, Rind               | 222                      |
| Alkalische Phosphatase      | -         | ?       | 2          | Escherichia coli               | 32,56                    |
| "                           | -         | ?       | ?          | Niere, Schwein                 | 182                      |
| "                           | -         | ?       | ?          | Niere, Mensch                  | 1                        |
| "                           | -         | ?       | ?          | Leukozyten, Mensch             | 222                      |
| "                           | -         | ?       | ?          | Darm, Kalb                     | 74                       |
| Metallothionein             | -         | 9.000   | 9          | Niere, Mensch u. Pferd         | 114,239                  |
|                             |           |         |            | Leber, Kaninchen               | 222                      |
|                             |           |         |            | Leber, Ratte                   | 233                      |
| Phospholipase C             | -         | ?       | ?          | Bacillus cereus                |                          |
|                             |           |         |            | Clostr. perfringens            | 218                      |
| Proteinase                  | -         | 26.000  | 1          | Schlangengift                  | 222                      |
| Aldolase                    | -         | 65.000  |            |                                |                          |
|                             |           | -75.000 | 1          | E.coli, A.niger, Hefen         | 222,324                  |
| Thermolysin                 | -         |         |            | (Endopeptidase)                |                          |
| Zinkproteid der Leukozyten  | -         | ?       | ?          | Leukozyten, Mensch             | 308,312                  |
| Serumproteine               |           |         |            | Albumine und Glob., Schwein    | 343                      |
| Vitellin                    |           |         |            | Eidotter                       | 302                      |
| Hämoglobin                  |           |         |            |                                | 51,89                    |
| Nyoglobin                   |           |         |            |                                | 51                       |

Tabelle 14: Metallenzymkomplexe, die durch Zn aktiviert werden

| Enzym                    | aktiviert durch | blockiert durch         | Autor   |
|--------------------------|-----------------|-------------------------|---------|
| RNase                    |                 | Zn                      | 43      |
| Arginase                 | Mn, Zn, Cd      |                         | 222     |
| Enolase                  | Zn, Mn, Mg      |                         | 222     |
| Lecithinase              | Zn, Mn, Cu      |                         | 222     |
| Carnosinase              | Zn, Mn          |                         | 222     |
| Histidin-Deaminase       | Zn, Hg, Cd      |                         | 222     |
| Galaktose-DH             |                 | Zn, Fe, Cu              | 32      |
| Alkalische Phosphatase   | Zn              | Zn (hohe Konz.)<br>EDTA | 32, 247 |
| Phytase (Darm, Ratte)    | Zn              |                         | 247     |
| Amylase (B.subtilis)     | Zn              |                         | 27      |
| δ-Amino-Lävulin-säure-DH | Zn              |                         | 250     |

Carboxypeptidase hydrolysiert Ester und Peptide mit endständiger Carboxylatgruppe (337). In Carboxypeptidase A ist das für die Substratbindung notwendige Zn (307) an die Sulfhydrylgruppe gebunden (176, 337), bzw. an zwei Histidin-N, ein Carboxyl-O und ein H<sub>2</sub>O (148). Die Alkohol-DH in Pferde- und in Menschenleber, ferner in Hefen, ist ebenfalls ein zinkhaltiges Enzym (308, 310). Bei Entzug des Metalles zerfällt es in vier Untereinheiten. Zink-65 wird in ADH irreversibel eingebaut (222). Die Aktivität der Leber-ADH korreliert mit dem Leber-Zink und mit dem Zink in der löslichen Fraktion eines Leberhomogenates (247). DRUM et al. (65) definierten verschiedene Arten der Zinkbindung an ADH: eine lockere Bindung am aktiven Zentrum und eine feste zur Stabilisierung der Quartärstruktur. Alkalische Phosphatase wurde als Zinkenzym isoliert aus E.coli (56), Schweineniere (182), Kälberdarm (74), aus menschlichen Leukozyten und Nieren (1). Cystein bildet ein Chelat mit dem Zinkatom an der aktiven Seite des Enzyms (1). Weitere zinkbindende Gruppen sind eine Carboxyl- und eine Aminogruppe (56). Aus der Niere des Hundes konnte die renale Dipeptidase als Zinkenzym isoliert werden (49). Menschliche Leukozyten enthalten mit 22,5 µg Zink/Milliarde Zellen relativ viel Zink (306); die Existenz eines Zink-

proteids wird angenommen (222). Metallothionein, ein niedermolekulares Protein in der Nierenrinde von Mensch und Pferd, enthält Cd, Hg, Cu und auch Zn. Seine Funktion ist noch unbekannt (222,239). Der Metallothioneingehalt in Leber und Nieren der Ratte wird mit 0,1 bzw. 0,4 mg/g Gewebe angegeben. Bei Cadmiumvergiftung ist das Protein vermehrt (233).

Die Verbindung von Aktin und Myosin wird, wie die Vernetzung von Polypeptidketten, durch zweiwertige Ionen vermittelt (16, 251, 339). Nach Untersuchungen von SZENT-GYÖRGYI (288) ist Mg an der Actin-Myosin-Verbindung beteiligt.

Metallbindungen gehen die Transportproteine des Blutplasmas und der Milch ein: Transferrine, Lactotransferrine, Haptoglobuline, Caeruloplasmine, Erythrocuprein (27). RACOVEANU et al. (243) fanden schon nach zwei Stunden 80 % von injiziertem Zink-65 an Serum- $\alpha_1$ -Globuline und Albumine gebunden, nicht jedoch an Beta- und Gamma-Globuline. Die spezifische Aktivität des Zn-65 war am größten in der  $\alpha_1$ -Globulin-Fraktion. Im Hühnerei wird Zink-65 stabil in den Proteinanteil des Lipovitellins eingebaut (302).

Der Imidazolkern ist auch Bestandteil der Purinkörper, deren hohes Metallbindungsvermögen, unter anderem auch für Zink, bekannt ist (2, 324, 328). Die Affinität der Pyrimidine für Metalle ist bedeutend kleiner (27, 178, 328). Nukleotide besitzen eine stärkere Zink-Affinität als Nukleoside und Purine. Mit der Zahl der Phosphorgruppen steigt die Stabilität der Zink-Nukleotid-Komplexe (327, 328). ATP bildet stabilere Zinkkomplexe als ADP (68). Wichtig ist, daß Metallsalze durch die Verbindung mit ATP in eine lösliche Form übergeführt werden (324). Nukleotide binden Zn stärker als Ca und Mg, eine noch stärkere Bindung als Zn erfährt Cu (142, 316, 327). Der Weichmachereffekt von ATP kommt nach Auffassung von HAMM (106) durch Bindung von Zn und Ca zustande. Die Zinkkomplexe von NAD erweisen sich als wenig stabil (327): Zn koppelt möglicherweise NAD an das Enzymmolekül (310). Als Bindungsmöglichkeiten von Metallionen an Nukleotide werden a) eine koordinative Bindung an die Base,

und b) eine elektrostatische an die Phosphate diskutiert (11, 328). Eine Form der Kationenbindung an ATP ist in Abb. 12 schematisiert. Drei Möglichkeiten der Metallbindung

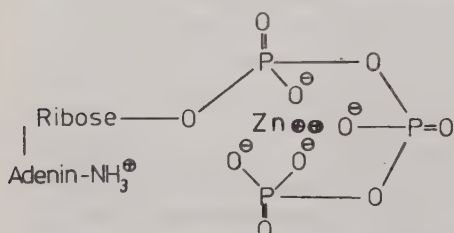


Abb. 12: Kationenbindung durch das ATP (211)

an Polynukleotide (Nukleinsäuren) scheinen möglich: Metallring, Zwischenform und Metallkette (382). Die Art der Ribose bleibt von fraglichem Einfluß (48). RNA enthält bedeutend mehr Zn als DNA (160). Zn bringt, ähnlich wie Kupfer, durch Ver-

knüpfung der Purinbasen die Nukleinsäureketten näher aneinander (48, 270). Nach WESEK (331) ist in Zellkernen Zink an Protein gebunden. RNA findet sich auch im Aktomyosin (229), DNA und RNA in Mitochondrien (271); die RNS des Muskels ist größtenteils an die Myofibrillen gebunden (229).

Mucopolysaccharide bilden Metallkomplexe. Carboxylgruppen, Schwefelsäureester und eventuell Kieselsäureester wirken dabei als Biokationenaustauscher (27). Hyaluronsäure und Chondroitinsulfat sind in der Lage, Elektrolyte zu binden. Das Sarkoplasmatische Reticulum besteht aus Mucopolysacchariden, welche die Calcium-Konzentration steuern (29). Zink wird statt Eisen in Protoporphyrine und Porphyrene eingebaut. Bei dem Hefepilz *Saccharomyces cerevisiae* kommt es dadurch zu einer Hemmung der Atmung (215). Porphyrine wirken stark chelatbildend. Bei Überschuß im Organismus vermögen sie Zink zu binden (232, 312) und können so das Krankheitsbild der Porphyrie beeinflussen (250). Im Urin werden Porphyrinkörper als Zinkkomplexe ausgeschieden (321).

In Myoglobin wird ein Zinkion unter Konformationsänderung des Proteins von zwei Imidazolgruppen gebunden (51). Weiter wird noch Zinkkomplexbildung in Pflanzen aufgeführt: Pectine (230), Chlorophyll (27), Phosphate (215), Pteridine (2) und Phytin (214, 215) können Zink binden.

Tabelle 15: Zinkbindung an morphologische Strukturen der Zelle

| Struktur                             | Beschreibung                                       | Literatur               |
|--------------------------------------|----------------------------------------------------|-------------------------|
| Zellkern                             | Nukleoprotein in Tumorgewebe                       | 17, 18, 116             |
|                                      | NS- und Proteinsynthese-<br>hemmung bei Zinkmangel | 255                     |
|                                      | DNA- und RNA-Synthese                              | 305, 330, 331           |
| Mitochondrien                        | Glutamat-DH in Rinderleber                         | 18, 20, 32, 135,<br>309 |
|                                      | Kationen an Mitochondrien-<br>Innenmembran         | 14                      |
| Ribosomen                            | Zn assoziiert Untereinheiten                       | 28, 291                 |
| Mikrosomen                           | Alkalische Phosphatase                             | 32                      |
| Lösliche Fraktion<br>oder Zytoplasma | Lactat-DH, Alkohol-DH,<br>Carboanhydrase           | 247, 266, 311           |
| Actomyosin                           |                                                    | 106, 162, 298,<br>322   |
| Actin                                |                                                    | 112                     |
| Erythrozyten                         | Carboanhydrase, Lactat-DH,<br>Hämoglobin           | 89, 138                 |
| Leukozyten                           | Zinkprotein                                        | 341                     |
| Eosinophile Leu.                     | Zinkpositive Granula                               | 245                     |
| Gewebsmastzellen                     | Zn-Histamin-Heparin-Komplex                        | 139                     |
| Plasmaproteine                       | Transportproteine                                  | 89, 243, 300,<br>324    |
| Darmmucosazellen                     | Carrier für Zink                                   | 50, 67                  |

## 7. Zinkbindung an morphologische Strukturen

BERSIN (27) betrachtet eine Menge von Zellen als einen Pool.

In ihm erfahren Mineralien gegenüber der extrazellulären Flüssigkeit Konzentrationsänderungen. Aber auch im intrazellulären Zink konnten Konzentrationsgefälle festgestellt werden (18, 293). FUHRMANN u. ROTHSTEIN (82) beschrieben die Wechselbeziehungen zweiwertiger Kationen mit der Zellmembran. Als Untersuchungsobjekt dienten Hefezellen. Gefunden wurde 1) eine unspezifische Bindung an anionische Gruppen und 2) ein spezifischer Transport des Zn in einen nicht-austauschbaren zellulären Pool im Austausch gegen  $K^+$ . Die Affinität der Membran zu Metallen fällt in der Reihenfolge Mg Co Zn Mn Ni Ca Sr. Eine Vielzahl von Hinweisen über einen passiven Zinktransport liegen weiter vor (55,

190, 241, 254). In der Darmmucosa wurde für Cu und Zn ein Carrier gefunden (50). Eine Synopse über die Bindungen des Zinks an morphologische Strukturen der Zelle und an zinkaffine Gewebe vermitteln die Tabellen 15 und 16.

Tabelle 16: Zinkaffine Gewebe

| Gewebe        | Beschreibung                                                                          | Literatur         |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| Leber         | Zinkaufnahme bei Intoxikation<br>Zinkenzyme                                           | 254               |
| Pankreas      | Insulin und Zink                                                                      | 80,252,294<br>324 |
|               | Carboxypeptidase                                                                      | 337               |
| Prostata      | dorsolateraler Teil bei der Ratte                                                     | 92,184,192<br>305 |
| Sperma        | Zinkreichtum von Samenplasma und<br>Spermien, Zn-65-Anreicherung                      | 184,192,305       |
| Hypophyse     | ACTH                                                                                  | 324               |
| ZNS           | Zinkprotein in einem Bereich des<br>Hippocampus                                       | 188               |
| Auge          | Chorioidea mit Tapetum lucidum der<br>Carnivoren; kristalliner Zn-Cystein-<br>Komplex | 231,324           |
|               | Retina                                                                                | 9                 |
| Epidermis     |                                                                                       | 26,192,198,       |
| Haar          |                                                                                       | 247               |
| Schlangengift |                                                                                       | 61,324            |
| Muskulatur    | dunkelgefärbter Muskel                                                                | 43                |

### 3. Zink und Muskelfunktion

UNDERWOOD (304) verweist darauf, daß die Muskulatur nicht nur als Zinkspeicher fungiere. Zink sei auch in Struktur- und Reaktionsmechanismen eingebaut. Zudem weist das Zink in Abhängigkeit von der anatomischen Lage des Muskels charakteristische Konzentrationen auf.

EDMAN (68) sieht Zink als eine neue Art von Erschlaffungs-

faktor: Bei der Kontraktion des Muskels wird ATP gebunden; das entstehende ADP setzt Zn frei, was entspannend auf die Muskelfaser wirkt. Bei der Glycerinextraktion verliert der Muskel die gleiche Zinkmenge, die zur Relaxation erforderlich wäre, nämlich 3 - 4 mMol/kg TS (68). Zink- und Kupferglycocoll wirken auf das kontrahierte FasermodeIl reversibel erschlaffend (111). Fraglich bleibt, ob Zn in die Actin-Myosin-Bindung eingreift, die durch SH-Gruppen (15, 133, 162, 298, 322), bzw. Magnesium (286) zustande kommt. Tabelle 17 bringt schematisch den Zusammenhang zwischen Zinkkonzentration und Muskelfunktion.

Tabelle 17: Zinkgehalt und Funktion verschiedener Hühnermuskeln (137)

|                                     | Brustmuskel                | Extremitätenmuskel |
|-------------------------------------|----------------------------|--------------------|
| Proteingehalt                       | +++                        | ---                |
| Zinkgehalt und Aufnahme von Zink-65 | ---                        | +++                |
| Muskelfunktion                      | kurzfristige Beanspruchung | Dauerleistung      |

#### 4. Zink und Muskelenzyme

Die Zinkenzyme Carboanhydrase und Glutamat-DH (307, 309) sind ohne Bedeutung für den End-ph des Fleisches. Ihn regelt über die Milchsäurebildung das Enzym Lactat-DH. In Kaninchenmuskel und Rinderherz enthält die LDH Zn als funktionellen Teil (311, 312). Das an LDH gebundene Zink stellt jedoch nur einen unbedeutenden Anteil am Gesamt-Zink dar (53). Nach PFLEIDERER u. WIELAND (231) wirkt LDH auch ohne Zink; LDH weist sogar je nach Organ typische Aminosäuresequenzen auf (188).

Die spezifische Aktivität der LDH (Enzymaktivität/lösliches N) ist in den wasserlöslichen Fraktionen der Mm. serratus, rectus und trapezius gering, was auf eine Bindung der LDH an die unlösliche Fraktion hindeutet (286). BERMAN (23) fand in 8 verschiedenen Muskeln eines Rindes eine positive Korrelation

von LDH und wasserlöslichem N.

Als gesichert gilt, daß Zn als Bestandteil von Enzymen den Muskelstoffwechsel beeinflußt. Die bisherigen Untersuchungen brachten jedoch recht unterschiedliche Ergebnisse. BRISKEY u. WISMER-PEDERSEN (42) fanden im *M. long. dorsi* verschiedener Schweine eine Abhängigkeit der LDH-Aktivität vom Zinkgehalt, SWIFT u. BERMAN (24) hingegen in Rindermuskeln (verschiedener anatomischer Lage) eine negative Korrelation zwischen Zn und LDH.

## 5. Muskelfarbe und Zink

Die Farbe des Fleisches wird maßgeblich von der Menge der Muskelfarbstoffe und der Art und Stärke der postmortalen pH-Entwicklung bestimmt (53). Muskelfasern mit dunkler Farbe enthalten mehr Zink als helle Fasern (24, 43, 52, 53). Über weitere Unterschiede heller und dunkler Fasern informiert Tabelle 18. Da aus jedem hellen Muskel, z.B. durch Verpflanzen einer Sehne oder durch Training (163), ein roter entstehen kann (13), entwickeln sich Myoglobin- und

Tabelle 18: Vergleich von hellen und dunklen Muskelfasern

| Eigenschaft                 | helle Fasern  | dunkle Fasern |
|-----------------------------|---------------|---------------|
| Zink und Myoglobin          | wenig         | viel          |
| Querschnitt                 | groß          | klein (52)    |
| Sarkoplasma                 | wenig         | viel (52)     |
| Mitochondrien               | wenig         | viel          |
| Wassergehalt                | hoch          | gering        |
| Glycogen                    | reichlicher   | weniger       |
| Fett- und Lipasegehalt      | niedrig       | hoch          |
| Stoffwechsel                | anaerober     | oxydativ,     |
|                             | Glycogenabbau | Fettabbau     |
| Phosphorylase               | viel          | wenig         |
| Reaktionsfrequenz           | schnell       | langsam       |
| Reizschwelle                | hoch          | niedrig       |
| Ermüdbarkeit                | schnell       | langsam       |
| Succinyl-DH, Cytochrom      | wenig         | viel          |
| Sarkopl.Reticulum, Ca-Pumpe | viel          | wenig (21)    |

Zinkkonzentration offensichtlich in Abhängigkeit von der Muskelfunktion. Bei Sauerstoffnot kann der Myoglobingehalt bis um 170 % des Ausgangswertes steigen (93). CASSENS et al. (52) konnten durch Bewegen der Schweine kurz vor dem Schlachten in der Muskulatur keinen veränderten Zinkgehalt feststellen. VAN LEEUWEN und VAN DER GRIFT (166) ermittelten bei Zinkzusätzen zu Kälberfutter unter Absetzen des Soyabohnenschrotes in der Leber bei abnehmendem Kupfergehalt hohe Zinkwerte. Gleichzeitig beobachteten sie eine stärkere Fleischigkeit der Hinterviertel und eine blässere Kalbfleischfarbe.

Zink geht mit Myoglobin und Hämoglobin reversible Bindungen ein (51). Myoglobin ist in der Muskelfaser vermehrt in der I-Bande lokalisiert (93). Über in Schweinemuskeln gemessene Gehalte an Zink und Myoglobin informiert Tabelle 19.

Tabelle 19: Zink und Myoglobin in Schweinemuskeln (53)

| Eigenschaft             | M.long.dorsi | M.trapezius |
|-------------------------|--------------|-------------|
| µg Zink/g TS (fettfrei) | 69           | 217         |
| mg Mb/g TS (fettfrei)   | 3,92         | 10,0        |
| End-ph (24 h)           | 5,46         | 5,77        |

Auch bei Rindermuskel schwankt der Zinkgehalt zwischen 21 und 74 µg/g Frischsubstanz, je nach Farbe des Muskels (24, 286). Bemerkenswert erscheint noch, daß PSE-Fleisch, wie blässer Schweinemuskel, auch weniger Zink enthält als normales Fleisch (42). Myoglobin korreliert positiv mit dem End-ph von Schweinemuskeln (41, 53, 259).

## 6. Löslichkeit der Muskelproteine - Beziehung zum Zinkgehalt

Zink beeinflusst die Proteinlöslichkeit. Aussalzen mit Zinksalzen ist ein schonendes Verfahren der Proteinfällung (51, 57, 324). Die Entfernung natürlich vorhandenen Zinks aus einem Muskelhomogenat beeinflusst nicht die Löslichkeit der Proteine (98). Eine positive Korrelation des Zinkenzym LDH zum wasserlöslichen N wies BERNAN (23) in acht Rindermuskeln nach.

## 7. Beziehung des Zinks zum Wasserbindungsvermögen des Fleisches

Vorangestellt seien einige Begriffsbestimmungen des Wasserbindungsvermögens (WBV). Anomalie des Gefrierpunktes, Lösungsvermögens, der Kernmagnetresonanz (115), des Dampfdruckes (46) oder der Dichte bestimmen das "echte Hydratationswasser". Der Begriff "freies Wasser" bezeichnet den Rest des Muskelwassers. Weitere Termini geben an, inwieweit es immobilisiert ist. Wasserbindungsvermögen bedeutet die Fähigkeit des Fleisches, sein eigenes oder auch zugesetztes Wasser bei Anwendung irgendeiner Kraft (Pressen, Erhitzen) festzuhalten. Das Ergebnis, nämlich "lockeres Wasser" oder "gebundenes Wasser" ist von der Methode abhängig. Häufig bezieht man die Menge des "gebundenen Wassers" auf die Gewichtseinheit Muskel oder Muskeleiweiß (90). Unter "Quellung" wird die spontane Aufnahme von Wasser durch Fleisch aus einer umgebenden Flüssigkeit unter Gewichts- und Volumenzunahme verstanden. Zum WBV besteht Übereinstimmung: gemessen wird die Gewichts- oder Volumenänderung beim Einlegen von Muskelstücken in Lösungen. Unter dem Terminus "Muskelhydratation" werden Wasserbindung und Quellung im weiteren Sinne beschrieben. Die weitere Einteilung wird in der Tabelle angegeben.

Tabelle 20: Das echte Hydratwasser und das freie Wasser des Muskels

| Bezeichnung des Wasseranteiles | Menge im Muskel                                                                                                                   | Autor                    |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| ECHTES<br>HYDRATWASSER         | ca. 10 % des Muskelwassers<br>4 - 5 % des Muskelwassers<br>22 g/100 g Eiweiß im Rindermuskel<br>16 g/100 g Eiweiß im Rindermuskel | 115<br>103<br>248<br>103 |
| FREIES WASSER                  |                                                                                                                                   |                          |
| davon immobilisiert            | 350 g/100 g Eiweiß im Rindermusk.<br>bis 800 g/100 g Eiweiß im<br>Homogenat                                                       | 106<br>106               |
| davon locker                   | bei Druck austretend                                                                                                              |                          |

## 1. Wahres Hydratwasser

Als wahres Hydratwasser wird im allgemeinen diejenige Wassermenge im Muskel bezeichnet, die Protein in mono- und multimolekularer Adsorption aufnimmt. Die Menge des Hydratwassers hängt nicht von der Muskelstruktur ab (103) und wird durch Kontraktionszustand, pH und Ionenstärke nicht beeinflusst (40, 248). Für die feste Bindung des Wassers kommen vor allem die hydrophilen (polaren) Gruppen des Eiweisses in Betracht (77). Es handelt sich dabei um zwei Arten von hydrophilen Gruppen (277), nämlich um a) dissoziierende Gruppen von Proteinseitenketten, die Träger positiver und negativer Ladungen werden können; dies sind Carboxyl-, Amino-, Hydroxyl- und Sulfhydrylgruppen. b) Nicht-dissoziierende Carboxyl- und Aminogruppen der Peptidbindungen, die ungeladen sind und die Wassermoleküle über Wasserstoffbrückenbindungen an sich ziehen. Über Reaktionen von funktionellen Gruppen des Proteins mit Wasser informiert Abbildung 13. Für Struktur und Eigenschaften der Proteine sind namentlich die Wasserstoffbindungen zwischen dem Wasserstoff der NH-Gruppen und dem Sauerstoff der CO-Gruppen von Bedeutung ( $\text{C} = \text{O} \cdots \cdots \text{H} - \text{N}^+$ ). Nach PAULING (224) besteht das erste Stadium der Wasserbindung durch Proteine in der Anlagerung eines Moleküls Wassers an eine polare Gruppe. Die Hydratation eines Proteins korreliert nach BULL und BREESE (46) eng mit der Summe seiner polaren Gruppen minus Amidgruppen. Ein polarer Rest soll etwa 6 Mol Wasser komplex binden. Die Amidgruppe (Glutamin, Asparagin) hemmt offenbar die Bindung von Hydratwasser. PAULING (224) vermutete, daß die Peptidgruppe ohne Bedeutung für die Wasserbindung sei. MELLON et al. (189) und VANDENHEUVEL (315) fanden jedoch eine Beteiligung der CO - NH -Gruppe an der

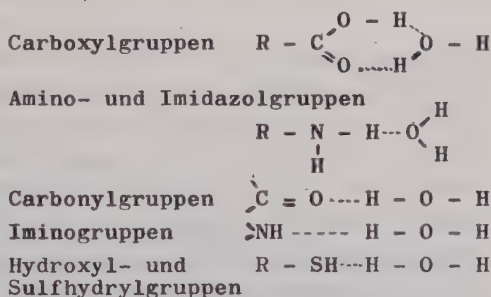


Abb. 13: Einbau des Wassermoleküls in organische Seitenketten (277)

Hydratation der Proteine. In gewissem Gegensatz zu diesen Ergebnissen steht die Annahme von ESIPOVA und CHIGADZE (77), wonach in Tropomyosin und Myosin wegen deren Helixkonformation Peptidbindungen nicht mit Wassermolekülen in Kontakt treten können.

Nach einer Hypothese von KLOTZ (153) können auch unpolare hydrophobe Seitenketten von Proteinen die Hydratation beeinflussen. Sie induzieren gitterartige Anordnungen eines Wassermantels ("eisartige Strukturen"). Auch in der Kontraktionstheorie von SZENT-GYÖRGYI (289) spielen ähnliche Vorstellungen von "flüssigem Eis" eine Rolle. Die gestreckte Form des Myosinmoleküls soll dabei durch die gitterartige Struktur des umhüllenden Wassermantels aufrechterhalten werden. Aus Kernmagnetresonanzmessungen glauben HAZLEWOOD et al. (115) in Muskulatur auf zwei verschiedene Arten von gebundenem Wasser schließen zu können: Die Beweglichkeit der  $H_2O$ -Moleküle ist in Translation und Rotation eingeschränkt; ein Zusatz von NaCl verändert dies nicht.

## 2. Freies Wasser

Obgleich die Menge an echtem Hydratwasser nur 16 - 22 g je 100 g Protein betragen kann, enthält Fleisch 74 - 76 % Wasser. Auf 100 g Protein kommen demnach 350 - 360 g Wasser. Der größte Teil des im Muskel vorhandenen "freien Wassers" liegt in immobilisiertem Zustand vor; es fließt beim Anschneiden des Fleisches nicht heraus, sondern wird erst bei Anwendung von Druck abgegeben. Es scheint sich um "freies" Wasser zu handeln, welches durch das Netzwerk von Membranen und Filamenten der strukturellen Proteine (114), wahrscheinlich durch Querverbindungen und elektrostatische Kräfte zwischen den Peptidketten, immobilisiert ist (100, 103, 104).

## 3. Immobilisierung des freien Wassers

Die Annahme von "Haftkräften" (203) entbehrt der experimentellen Begründung (117). Es wäre möglich, daß zwischen den Molekülen oder Filamenten eisartige Strukturen im Sinne

von KLOTZ (153) und SZENT-GYÖRGYI (289) entstehen, d.h. Wassermoleküle ordnen sich an Oberflächen unter Bildung ausgedehnter Gitterstrukturen. Nach der Theorie der Rolle hydrophober Proteingruppen bei der Wasserbindung (153, 171, 208, 238) sind die unpolaren Seitengruppen der Aminosäuren Valin, Leucin, Isoleucin und Methionin dabei wichtig. Die Wassermoleküle ordnen sich in gitter- bzw. käfigartigen voluminösen Strukturen an, wobei sie durch Wasserstoffbindungen gekoppelt werden. Zerstörung der Wasserstruktur durch zugesetzte polare Stoffe oder durch Erwärmen führt zu Denaturierung (153).

Der ph-Wert beeinflusst die Ionenbindung an Proteine und folglich auch das WBV (96), bzw. die Ionenbindung ihrerseits die Pufferkapazität des Proteins und somit den ph-Wert (259). Eine positive Korrelation besteht zwischen ph und WBV bei Fleisch mit (42, 53, 100, 286) und ohne Zusätzen (97, 99, 103).

#### 4. Wasserbindung in der Muskelstruktur

70 % des Muskelwassers sind in den Fibrillen, 20 % im Sarkoplasma und 10 % im extrazellulären Raum lokalisiert. Im zerkleinerten Rindermuskel verteilt sich das WBV wie folgt auf die Inhaltsstoffe (103, 106):

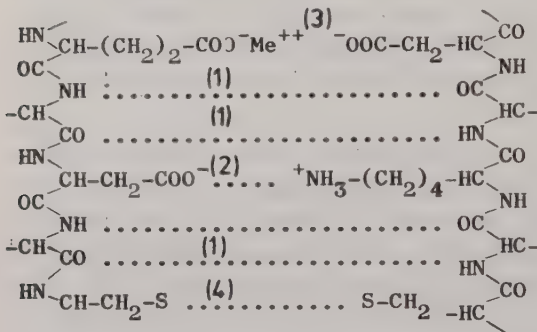
- Myofibrillenproteine 50 %,
- Sarkoplasmaproteine 3 % und
- Nichteiweißverbindungen des Sarkoplasmas 47 %.

Im Sarkoplasma gelöste Salze tragen als Folge ihrer Wechselwirkung mit dem myofibrillären Protein erheblich zum WBV bei.

Freilegen von Fibrillen steigert das WBV (74). Die Hauptmenge des immobilisierten Wassers wird dabei von den Actomyosinfilamenten festgehalten. Eine Erhöhung des Abstandes zwischen Actin und Myosin durch eine erhöhte Proteinnettoladung oder durch gelöste Querbindungen führt zu einer Zunahme an immobilisiertem Wasser. Die Abstoßung einzelner Peptidketten innerhalb der Filamente unterstützt diesen Effekt. Man spricht von einem sog. Stereoeffekt (99, 251).

An solchen intermolekularen Brücken in Proteinen kommen in Betracht, wie Abbildung 14 zeigt:

- 1) Wasserstoffbindungen zwischen den  $-CO$  und  $-NH$ -Gruppen der Peptidbindungen, weiter die von  $-SH$  und  $-OH$ -Gruppen,
- 2) "Salzbindungen" zwischen den positiv und negativ geladenen Gruppen des Proteins,
- 3) Querverbindungen, die durch salzartig gebundene zweiwertige Kationen gebildet werden und
- 4) Disulfidbrücken des Cysteins.



Den Quellungszustand im lebenden Muskel versucht man im allgem. auf Grund der Theorie des osmotischen Druckes bzw. der Donnan-Gleichgewichte zu erklären, die Quellung im zerkleinerten Fleisch durch Adsorptionsvorgänge (106).

Abb. 14: Art der Querverbindungen in Proteinen (99)

#### 5. Beziehungen der Muskelkationen zum Wasserbindungsvermögen

Mehrwertige Kationen vermögen bekanntlich die Hydratation von Proteinen und die Quellung von Geweben herabzusetzen, indem sie Peptidketten unter Bildung von Querbrücken verknüpfen (114). Eine Verdichtung der Struktur ist die Folge. Der Entzug mehrwertiger Kationen äußert sich dagegen in einer Erhöhung der Quellung (1, 7, 53, 100, 325, 266, 292). Bei pH 7 bewirkt in Rindermuskel ein partieller Austausch von Muskel-Calcium und -Zink eine beträchtliche Erhöhung seines WBV. Wahrscheinlich setzt auch proteingebundenes Mg das WBV herab; es ist so fest an die Myofibrillen gebunden, daß es nicht ganz entfernt werden kann (103, 106). Möglicherweise sind aber nicht nur Peptidketten, sondern auch Myosin und Actin durch Erdalkalibrücken verknüpft (16). Das Ca-Bindungsvermögen ist in den Gebieten des Sarkomers, in denen sich Actin- und Myosinfilamente überlappen, besonders stark entwickelt (339). Allerdings verringern zweiwertige Ionen den

Abstand zwischen Myosinfilamenten nur, wenn dem Myosin Actin gegenübersteht (251). Actin-Monomere scheinen durch ein zweiwertiges Kation über Nukleotidgruppen verbunden zu sein (301). NEMETSCHKE und GANSLER (209) beobachteten elektronenmikroskopisch, daß Ca-Ionen auf Elementareinheiten der Kollagenfibrille dergestalt quervernetzend wirken, daß zwei Karboxylatgruppen benachbarter Fibrillen über ein zweiwertiges Gegenion gebunden werden können.

Der Gesamtgehalt an Erdalkalien im Muskel sagt noch nichts über ihren Bindungszustand aus (10). SWIFT und BERMAN (286) fanden zwar beim Vergleich von Rindermuskeln zwischen WBV und Mg, sowie WBV und CA eine negative Korrelation, doch ergab ein Vergleich von Schweinemuskeln keine derartige Beziehung (88). Zwischen dem wasserextrahierbaren Ca und Mg und dem WBV von Rindfleisch konnte ebenfalls kein Zusammenhang festgestellt werden (106). Der Aschegehalt von Rindfleisch ist nach Untersuchungen von MCCLAIN und MULLIUS (185) mit dem WBV signifikant negativ korreliert. SWIFT und BERMAN (286) fanden, daß intrazelluläre Komponenten - K, P, Protein, Ca, Mg - negativ, extrazelluläre Komponenten - Na, Cl - positiv mit dem WBV des Rindermuskels korreliert sind.

#### 6. Alkalimetalle und Wasserbindungsvermögen

100 g Muskel enthalten 300 - 400 mg K und 40 - 70 mg Na. Nach neueren Untersuchungen stehen dabei 70 % der Na-Ionen mit irgendwelchen Makromolekülen des Muskels in Wechselwirkung (59, 152). Auch Kalium-Ionen sollen weitgehend in gebundenem Zustand vorliegen; es ist namentlich in den A-Banden lokalisiert (106). Nach ROME (251) muß ein großer Teil der in der intrazellulären Flüssigkeit vorliegenden Ionen gebunden sein, weil sich statt der üblicherweise angenommenen Ionenstärke von 0,15 - 0,71 (21) nur eine solche von 0,015 ergibt. Der Einfluß der Alkalien auf das WBV ist vergleichsweise gering (87, 97, 108).

### 7. Sarkoplasmasalze und Wasserbindungsvermögen

Der größte Teil der Mineralstoffe des Muskels ist im Sarkoplasma gelöst. Er kann durch erschöpfende Extraktion mit Wasser aus dem Gewebe entfernt werden. Diese extrahierten Mineralstoffe des Sarkoplasmas tragen sehr erheblich zum WBV des Muskels bei; sie erhöhen vor allem das WBV der strukturellen Muskelproteine (103). Saftverluste, wie sie beim Auftauen von Gefrierfleisch auftreten können, verursachen wegen des damit verbundenen Verlustes an Mineralstoffen eine Abnahme des WBV. Die Wirkung der Sarkoplasmasalze auf Muskel normalen Wassergehaltes stellt einen typischen Anioneneffekt dar; der IP der Myofibrillenproteine wird nämlich zu niedrigeren ph-Werten verschoben. Muskelanionen sind Phosphat, Lactat, Chlorid, und Sulfat (103). Bei steigendem Fremdwasserzusatz tritt der Einfluß der Kationen in Erscheinung, sodaß den Myofibrillenproteinen Wasser entzogen wird (103).

### 8. Muskelzink und Wasserbindungsvermögen

Ungeklärt ist die Bedeutung des Zinks allein - ohne andere Kationen - für das WBV von Fleisch (98). Fest steht, daß Myofibrillen Zink fest gebunden enthalten (98), Zink ist dabei teilweise an Myosin gebunden (127). Ein Zusatz von Zinkionen setzt das WBV von Fleisch stark herab (97), was aber keineswegs besagt, daß sich das fest an fibrilläres Eiweiß gebundene fleischeigene Zink ebenso verhält.

Von besonderem Interesse ist die Zinkbindung

"R<sub>1</sub> - Imidazol - Zn - Imidazol - R<sub>2</sub>", weil durch sie Ketten von Makromolekülen miteinander vernetzt werden (325).

Muskeln mit hohen Zinkgehalten lassen theoretisch ein geringes WBV erwarten, da Zn als zweiwertiges Kation Wasser verdrängt und das Zinkenzym Lactat-DH ph-senkend wirkt.

BERMAN et al. (24, 286) wiesen jedoch nach, daß bei Rindermuskeln zwischen Zinkgehalt und WBV eine positive Korrelation besteht. Anscheinend maskiert der in zinkreicher Muskulatur hohe End-ph die wasserverdrängenden Eigenschaften des Zinks.

Zwischen Zinkgehalt und der Aktivität zinkhaltiger Enzyme

ergibt sich in Rindermuskeln kein Zusammenhang (24). Er besteht jedoch offenbar in Schweinemuskeln (42). Zinkgehalt und WBV geben beim *M. longissimus dorsi* des Schweines keine signifikante Korrelation (42, 52, 53). Zinkmangel im Futter verändert den Gehalt der Muskulatur an Zink nicht. Er bewirkt jedoch geringeres WBV.

Nach Überlegungen HAMMS (106) kann das an die Myofibrillen gebundene Zink einen unmittelbaren Einfluß auf das WBV ausüben. Für die Wasserbindung von Fleisch ist insbesondere die Dissoziation der Imidazolgruppe des Histidins von Bedeutung. Bevorzugter Ort der Zinkbindung ist aber die Imidazolgruppe (127). Durch Bindung des Zinks an Histidinreste des Myosins dürfte somit die Wechselwirkung der beim pH-Wert des post-rigor-Fleisches zum größten Teil dissoziierten Imidazolgruppen mit den negativ geladenen Gruppen des Proteins stark abgeschwächt werden. Die Folgen wären eine Verdichtung der molekularen Proteinstruktur und damit auch eine Verringerung immobilisierten Wassers, d.h. ein vermindertes WBV.

## 8. Muskel-Zink und pH-Wert des Fleisches

Negativ geladene Gruppen des Muskeleiweißes sind Carboxyl-, Sulfhydryl- und phenolische Hydroxylgruppen, positiv geladene Amino-, Guanidino- und Imidazolgruppen. Bei pH 2,2 sind alle basischen Gruppen, bei pH 11,5 alle sauren Gruppen dissoziiert. Die elektrostatische Bindung ist abhängig von der Ladung, dem Atomradius und der Dielektrizitätskonstanten des Mediums und nimmt bei pH-Erhöhung zu, weil die Ladung der Proteine zunehmend negativ wird (152). Bei Erniedrigung des pH-Wertes lockert sich die Zinkbindung wegen Protonation der bindenden Aminosäure Histidin (152). Das Wasserstoffion tritt dabei in kompetitiven Wettstreit mit dem Metallion (152, 246, 337). Auch die Entladung der Carboxyl- und Phenolgruppen der Proteine führt zu einer Lockerung der Zn-, Ca- und Mg-Bindung (106).

Von besonderer Bedeutung für die Qualität und Verarbeitung

des Fleisches ist in der Praxis der ph-Bereich zwischen 5,0 und 6,5. WBV und Quellungsvermögen werden aber in diesem Bereich stark beeinflußt (41, 53, 286). Ausschlaggebend ist die Änderung des Dissoziationszustandes von Histidin. Die Entladung der Imidazolgruppe des Histidins (siehe Abb. 15) durch ph-Erhöhung bringt nämlich eine starke Steigerung des WBV mit sich (106).

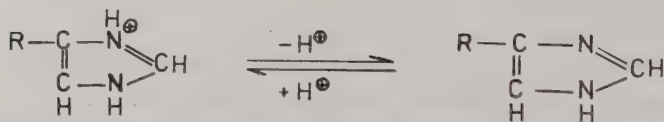


Abbildung 15: Dissoziation der Imidazolgruppe

Über Korrelationen von Zink, LDH, GDH und CA in verschiedenen Muskeln eines Rindes informiert die folgende Aufstellung. Die beim Rind zinkhaltigen Enzyme GDH und CA (138, 309)

Tab. 21: Korrelationen von Zn, LDH, GDH und CA mit dem End-ph in Rindermuskeln (24)

| Korr. mit dem End-ph | r       |
|----------------------|---------|
| Zink                 | + 0,966 |
| Lactat-DH            | - 0,972 |
| Glutamat-DH          | + 0,3   |
| Carboanhydrase       | + 0,6   |

beeinflussen den End-ph nicht signifikant (24), obwohl er unter anderem das Ergebnis der CA ist.

Eine hochsignifikante negative Korrelation besteht bei Rindermuskeln zwischen End-ph und LDH (24). Uner-

klärt bleibt die positive Korrelation des Zinks zum ph-Wert, da doch LDH ein Zinkenzym darstellt (24). Ca und Mg stehen in negativer Korrelation zum End-ph (286). Aber sowohl LDH als auch Aldolase wirken in der löslichen Fraktion der zinkreichen Mm. trapezius, rectus und serratus ventralis weniger aktiv als in der der zinkarmen Mm. longissimus und semimembraneus (24, 159). Nach PFLEIDERER (231) bleibt die Aktivität von LDH in Kaninchenmuskel nach Entfernung des Zinks erhalten. Zinkreichere Muskeln enthalten weniger Glycogen; dies mag mit zu ihrem hohen End-ph beitragen (287).

Unterschiede im Zinkgehalt verschiedener Stellen eines Schweinemuskels lassen keine Korrelationen zu postmortalen Eigenschaften erkennen (ph, WBV) (42, 53). Andererseits reagieren

anatomisch verschiedene Muskeln des Schweines mit typisch verschiedenen Zinkgehalten post mortem unterschiedlich (52, 53). BRISKEY und WISMER-PEDERSEN (42) fanden in Schweinemuskeln wie *M. longissimus dorsi* die niedrigsten Zinkgehalte bei raschem pH-Abfall und anschließendem pH-Anstieg, schlechtem WBV, minderwertiger Struktur und Farbe und geringer Methylenblau-reduktion.

## 9. Muskel-ATP und Zink

Im lebenden Muskel sind etwa 2,5 g ATP/kg oder  $5 - 8,5 \times 10^{-3}$  Mol ATP/kg enthalten (106). Die postmortale Abnahme der Wasserbindung beruht nach HAMM (99) zu zwei Dritteln auf dem ATP-Abbau und zu einem Drittel auf dem Sinken des pH-Wertes. Der Rigor ist allein auf den ATP-Abbau zurückzuführen. Es erhebt sich die Frage, auf welchem Wege ATP die Wasserbindung des Fleisches erhöht. HAMM (99, 100) nimmt an, daß diese Funktion des ATP auf einer komplexen Bindung der in das strukturelle Muskeleiweiß eingebauten Erdalkalimetalle beruht. Die Fähigkeit im Muskel vorhandener energiereicher Phosphate, mit zweiwertigen Kationen Komplexe zu bilden nimmt in der Reihenfolge Glucose-6-Phosphat AMP Inosin-MP ADP ATP zu (99, 316). Mg wird von ADP und ATP etwas fester, Zink sehr viel fester gebunden als Ca (142, 316, 327). Eine Anordnung dieser Verbindungen nach ihrer hydratisationssteigernden Wirkung ergibt die gleiche Reihenfolge wie oben (99).

ATP wird nur an Myosin, ADP auch an Actin gebunden. HAMM (106) nimmt an, daß ATP über Mg an Myosin gebunden werden kann, und daß es dadurch eine Lockerung im Zusammenhang der Filamente hervorruft. Eventuell werden dabei noch intermolekulare, durch zweiwertige Ionen gebildete Brücken, gespalten.

Die hydratisierende Wirkung der anorganischen Polyphosphate bei der Fleischverarbeitung glaubt HAMM (106) auch mit einer Eliminierung zweiwertiger Kationen bzw. einer Spaltung von Kationenquerbindungen erklären zu können.

# 10. Zusammenfassung von Korrelationen des Zinks mit Fleischeigenschaften

In Tabelle 22 wird eine Zusammenstellung von Korrelationen der Zinkgehalte mit wichtigen Eigenschaften der Fleischkunde aufgeführt. Positive (+), negative (-) und fehlende (f) Korr.

| Art der Muskulatur                      | Eigenschaften             |                               | Korrelation | Autor  |
|-----------------------------------------|---------------------------|-------------------------------|-------------|--------|
|                                         | 1.                        | 2.                            |             |        |
| Rind, 8 anatomisch verschiedene Muskeln | Zn                        | ph                            | +           | 24,286 |
|                                         | Fett                      | WBV                           | +           | 286    |
|                                         | LDH                       | wasserlösl. N                 | +           | 24,286 |
|                                         | Na                        | WBV                           | +           | 286    |
|                                         | Fe                        | WBV                           | +           | "      |
|                                         | Zn                        | WBV                           | +           | "      |
|                                         | ph                        | WBV                           | +           | "      |
|                                         | Wasser/Protein            | Zn                            | +           | "      |
|                                         | K                         | Protein                       | +           | "      |
|                                         | Mg                        | Protein                       | +           | "      |
|                                         | Ca                        | Protein                       | +           | "      |
|                                         | Chlor-Ionen               | WBV                           | +           | "      |
|                                         | Protein                   | WBV                           | -           | "      |
|                                         | LDH                       | ph                            | -           | 24,286 |
|                                         | LDH                       | Zn                            | -           | 24     |
|                                         | Aldolase                  | Zn                            | -           | 159    |
|                                         | Protein                   | Zn                            | -           | 286    |
|                                         | Phosphor                  | WBV                           | -           | "      |
|                                         | K                         | WBV                           | -           | "      |
|                                         | Mg                        | WBV                           | -           | "      |
|                                         | Ca                        | WBV                           | -           | "      |
| Rindermuskulatur                        | wasserextrhieres Ca u. Mg | WBV                           | f           | 106    |
| Rindermuskulatur                        | Muskelasche               | WBV                           | -           | 185    |
| Rind, 4 anatomisch verschied. Muskeln   | Myoglobin                 | myofibrill. ATPase            | +           | 162    |
|                                         | Myoglobin                 | intrazellul. Fett             | +           | 162    |
|                                         | Myoglobin                 | Succinat-DH                   | +           | 162    |
| Pferdemusk.                             | Myoglobin                 | ATP-resynthese                | +           | 163    |
|                                         | Myoglobin                 | Succinat-DH                   | +           | 163    |
| Schwein, M. longissimus dorsi           | Zn                        | WBV                           | f           | 42,52  |
|                                         | Zn                        | ph                            | f           | " "    |
|                                         | Zn                        | Myoglobin                     | f           | " ",53 |
|                                         | Myoglobin                 | ph                            | f           | 53     |
|                                         | Ca                        | WBV                           | f           | 88     |
|                                         | Mg                        | WBV                           | f           | 88     |
|                                         | ph                        | LDH                           | +           | 42     |
|                                         | WBV                       | LDH                           | +           | "      |
|                                         | Zn                        | LDH                           | +           | "      |
|                                         | WBV                       | ph                            | +           | 42,53  |
|                                         | ph LDH                    | Helligkeit                    | +           | 42     |
|                                         | ph LDH                    | Freies Wasser                 | +           | "      |
|                                         | Helligkeit LDH            | Phosphorylase (Glycogenabbau) | +           | "      |

Fortsetzung

Fortsetzung Tabelle 22

| Art der Muskulatur               | Eigenschaften |            | Korrelation | Autor     |
|----------------------------------|---------------|------------|-------------|-----------|
|                                  | 1.            | 2.         |             |           |
| Schwein, M.<br>longissimus dorsi | ph            | Helligkeit | -           | 42        |
|                                  | LDH           | Helligkeit | -           | "         |
|                                  | WBV           | Helligkeit | -           | "         |
| Schwein, verschiedene Muskeln    | ph            | Myoglobin  | +           | 41,53,260 |
|                                  | Myoglobin     | Zn         | +           | 52,53     |
|                                  | ph            | Zn         | +           | " "       |
|                                  | ph            | WBV        | +           | " "       |
|                                  | Zinkmangel    | Zn         | f           | 53        |
|                                  | Zinkmangel    | WBV        | -           | 53        |
|                                  | Zn            | LDH        | +           | 52        |

# 11. Zink bei der Fleischverarbeitung

Der Zinkgehalt des Fleisches interessiert vor allem im Hinblick auf die bei der Fleischverarbeitung beachtlichen Kriterien. Neuerdings interessiert auch der Zinkgehalt von Fleisch- und Fleischerzeugnissen aus umweltrelevanten Gründen. Es sei hier nur auf seine Querverbindungen zum Kadmium- und Kupfermetabolismus im Körper von Mensch und Tier hingewiesen (117). Einen Überblick über die Zusammenhänge zwischen Muskelzink und seinen möglichen Auswirkungen auf Fleischeigenschaften, insbesondere die Hydratation, versucht die Abbildung 16 zu vermitteln.

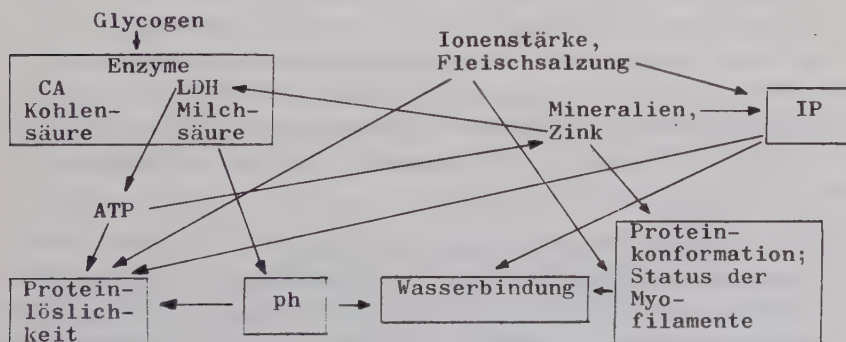


Abbildung 16: Ursachenkette zu Hydratation und anderen Einflußgrößen der Fleischverarbeitung

## 1. Zinkgehalt und Abschätzung von Fleischeigenschaften

BRISKEY und WISMER-FEDERSEN (42) beschrieben eine Reihe von, für die Entwicklung von weißem wässrigem Schweinefleisch wichtigen Faktoren: Glycogenreserven (a), Phosphorylaseaktivität und Bindungsstatus des Glycogens (b) und die LDH-Aktivität des Gewebes (c). Davon ist die LDH-Aktivität positiv mit der Zinkkonzentration des Gewebes korreliert. Über die Zusammenhänge zwischen PSE-Fleisch und Zinkgehalt informiert Tabelle 23. Da die Lactat-DH

Tabelle 23: PSE-Fleisch und Zinkgehalt

| Viel Zink                                          | Wenig Zink                                  |
|----------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| Tonusmuskeln<br>dunkel, trocken<br>hoher End-ph    | Kraftmuskeln<br>oft PSE<br>niedriger End-ph |
| Mm. serratus ventr.<br>trapezius, rectus abdominis | Mm. longissimus,<br>semimembranaceus        |

Zn enthält, könnte in zinkreichen Muskeln ein niedriger End-ph erwartet werden. BERMAN (24) wies jedoch in 8 verschiedenen Rindermuskeln eine positive Korrelation

des Zinks zum End-ph nach, und CASSENS et al. (52) stellten fest, daß Unterschiede im Zinkgehalt desselben Muskels keine Korrelationen zu postmortalen Eigenschaften wie ph und freies Wasser ergaben. Andererseits erhält man bei verschiedenen Muskeln, mit typisch verschiedenen Zinkgehalten, unterschiedliche post-mortem Ergebnisse. Der ph-Wert zinkreicher roter Muskulatur fällt post mortem langsamer als in zinkarmer blasser Muskulatur.

Die Zinkgehalte von Fleisch nehmen, je nach Tierart, in der Reihenfolge Rind-, Kalb-, Schweinefleisch von 77,9 auf 33,0 bzw. 22,4 ppm ab. Sie eröffnen für Fleisch verschiedener Tierarten bestimmte Untersuchungsmöglichkeiten. Dasselbe trifft zu für an mehreren Stellen des Tierkörpers entnommene Muskelproben.

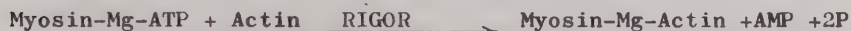
## 2. Behandlung der Tiere vor dem Schlachten

Als essentielles Element wird Zink in der Massentierzucht in zunehmendem Maße dem Futter zugesetzt. Eine genaue Kenntnis der Speicherung ist von entscheidender Bedeutung für

den erzielten Masterfolg (117). Zinkfütterung vor dem Schlachten verändert die Eigenschaften von Fleisch post-mortal nicht (52, 53). Zinkmangel verzögert jedoch das Wachstum und ergibt qualitativ schlechtes Fleisch (53, 194, 189); in Schweinefleisch sind  $\text{ph}$ , Myoglobin und Zink unverändert, das freie Wasser aber vermehrt (52).

### 3. Änderung der Wasserbindung durch Zink austausch

Während des Rigor ändert sich die Bindung von Ca, Mg und Zn an das fibrilläre Eiweiß nicht (102), das heißt, es werden weniger zweiwertige Ionen freigesetzt, als nach dem Abbau von ATP zu erwarten wäre. Von dieser Beobachtung ausgehend postulierte HAMM (100, 102) eine Rigortheorie:



In der Reifungsphase von Fleisch ist eine Zunahme der Wasserbindung zu beobachten, die nicht allein auf die Erhöhung des  $\text{ph}$ -Wertes zurückgeführt werden kann und mit einer Kationenfreisetzung zusammenhängen muß (99). Während der Reifung nimmt nämlich die Nettoladung der Fleischeiweiße zu, Hauptvalenzbindungen werden gespalten, und Ca- sowie Mg-Ionen freigesetzt (102). Zink wird post mortem nur aus wasserlöslichen Eiweissen, nicht aber aus Strukturprotein frei (102).

Die Entfernung zweiwertiger Kationen, darunter auch des Zn, bewirkt in einem Muskelhomogenat bei  $\text{ph}$  7 einen kräftigen Anstieg der Wasserbindung (98). Die Abgrenzung der Wirkung des Zinks von der des Calciums und Magnesiums ist noch unsicher. Ergebnisse von Versuchen mit Kationenaustauschern bilden die Grundlagen eines technischen Verfahrens zur Erhöhung der Wasserbindung des Fleisches durch Behandeln mit Folien aus Kunstharzaustauschern (342).

Bei Zusatz von 2 - 10 % NaCl zu Fleischbrei nimmt die Bindungsstärke von Ca, Mg und Zn ab (7).  $\text{Cl}^-$  und  $\text{Na}^+$  verbinden sich mit entgegengesetzt geladenen Proteingruppen, was dann zu einer Lockerung der Proteinstruktur, bzw. zu Salzbindungen führt. Der IP wird zur sauren Seite hin ver-

schoben.  $\text{Na}^+$  wirkt gegen zweiwertige Ionen wie ein Ionenaustausch. WBV und Proteinlöslichkeit nehmen zu (7).

HAMM (97) untersuchte die Wirkung verschiedener Salze auf die Hydratation von Muskelhomogenaten und fand eine gute Übereinstimmung mit den Hofmeister'schen Reihen. Chloride ergeben bei pH 6,4 eine in der Reihenfolge Zn Ca Ba Mg K Na Li zunehmende Hydratation; alle Salze, außer Zink, erhöhen das WBV.

Bei Zusatz von Phosphaten ist mit dem Einfluß unspezifischer Effekte der Ionenstärke (a), der Erhöhung des pH-Wertes (b) und der spezifischen Wirkung bestimmter Salze auf Actomyosin (c) zu rechnen. Die hydratationssteigernde Wirkung anorganischer Phosphate kann nach HAMM (106) in gleicher Weise erklärt werden wie der entsprechende Effekt physiologischer Polyphosphate: Eine Eliminierung der vernetzend wirkenden zweiwertigen Metalle durch komplexe Bindung bzw. die Spaltung einer Kationenquerbindung des Nukleotids bewirkt eine Auflockerung der molekularen Struktur des Gewebes und damit eine Zunahme an immobilisiertem Wasser. Dies verdeutlicht die Formel:

$\text{Protein-Me(II)-Protein} + \text{ATP} \longrightarrow \text{Protein-Me(II)-ATP} + \text{Prot.}$

BOZLER (36) konnte mit Natriumdiphosphat einen Teil des gebundenen Mg aus dem Muskel extrahieren.

Die Wirkung der Polyphosphate beruht nach KOTTER (157) nicht auf einer Eliminierung von Kationen, sondern auf einer Dissoziation des Actomyosins.

### III. Intrazelluläre Zinkverteilung

Die Funktion der Minerale in der extrazellulären Flüssigkeit besteht in der Aufrechterhaltung von Isotonie, Isonie und Isohydrie, die Funktion innerhalb der Zelle in Aktivation und Inhibition von Enzymen und in Wechselwirkungen mit Wasser und Protein (266). Die Beleuchtung dieser Vorgänge ermöglicht eine Untersuchung der Statik und Dynamik, als Lokalisation einerseits, als Bewegung und Permeation andererseits, der Minerale in den Zellräumen. Plasmamembran, Endoplasmatisches Reticulum, Kernmembran und äußere und innere Mitochondrienmembran unterteilen die Zelle in verschiedene Kompartimente. Die fünf Membranen und Räume der tierischen Zelle nach BERSIN (27) sind in Abb. 17 dargestellt.

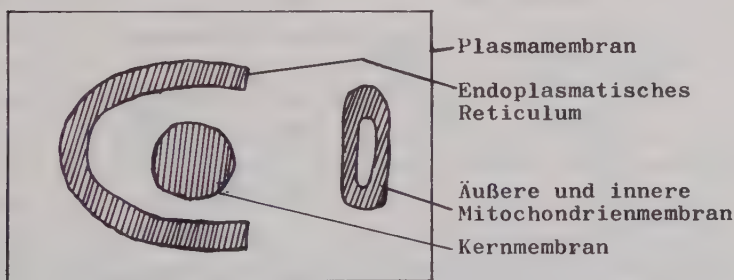


Abbildung 17: Die fünf Membranen und Räume der Zelle (27)

Intrazelluläre Verteilungsstudien sind mit dem Nachteil behaftet, daß beim Homogenisieren der Mineralstoffwechsel der Zelle grundlegend gestört wird. Trotzdem liegen Anhaltspunkte dafür vor, welche Zellorganellen Zink binden könnten. Konkurrieren verschiedene Chelatbildner um dasselbe Metallion, so zieht der mit der größten Stabilitätskonstanten das Metallion an sich (266). Auf diese Weise lassen sich vielleicht die Bewegungen des Zinks in den Zellräumen verstehen. Adenosin-Nukleotidphosphate bilden mit Zink Komplexe von um so größerer Stabilität, je länger ihre Phosphatkette ist.

Entsteht also bei der Atmung in den Mitochondrien aus ADP das ATP, wird intrazellulär vermehrt Zink gebunden und es könnte vom Zytoplasma in die Mitochondrien gezogen werden (266).

## 1. Zelluläre Strukturen

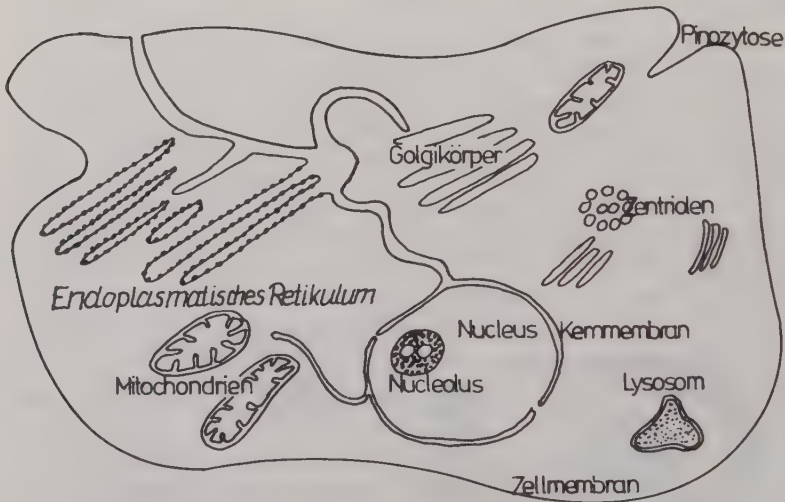


Abbildung 18: Diagramm einer Zelle auf der Basis einer elektronenmikroskopischen Aufnahme (110)

Robert Hooke entwarf im 17. Jahrhundert ein Bild vom Aufbau der Organismen aus kleinsten Hohlräumen, den cellulae. Das in der Zellforschung heute meist beschriebene Modell ist das der "Idealzelle" von 20  $\mu$  Größe, in der Zytoplasma und Organellen in typischer Form verteilt sind. Sie ist in der obigen Abbildung 18 dargestellt.

Einen Vergleich der Größe von Zellen und Organellen gibt Tabelle 24. Die Länge der Muskelzelle beträgt bei Wirbeltieren 1 - 5 ( - 12) cm (158), bei Insekten einige  $\mu$  bis einige cm (93), der Durchmesser 10 - 20  $\mu$ , im Alter des Tieres bis zu 200  $\mu$  (93).

Tabelle 24: Größe von Zellen und Organellen in  $\mu$  (128, 176)

|                           |                |
|---------------------------|----------------|
| Pflanzenzelle             | 5 - 100        |
| tierische Zelle           | 5 - 50         |
| Bacterium                 | 0,5 - 5        |
| Zellkern                  | 5              |
| Mitochondrion             | 0,5 - 5        |
| Ribosom                   | 0,02           |
| Auflösungsvermögen des EM | 0,0005 - 0,001 |

### 1. Zellmembran

Die Zellmembran tierischer Zellen ist im Lichtmikroskop nicht oder nur als optisch dichte Schicht (Ektoplasma) zu sehen (158). Elektronenoptisch stellt sie sich als 80 - 100 Å dicke Elementarmembran dar: die hydrophilen Kopfgruppen der Lipide mit der Proteinschicht bilden sich als zwei dunkle Linien ab, die hydrophoben Paraffinreste als helle Mittelschicht (28).

Kern- und Plasmamembran sind über das endoplasmatische Reticulum miteinander verbunden, d.h. die Kernmembran kann als Invagination aufgefaßt werden (110).

Das 0,1  $\mu$  dicke Sarkolemm, aufgebaut aus Reticulinfasern in Scherengitteranordnung, umkleidet schlauchartig die Muskelfaser und macht sie resistent gegen Säuren, Alkalien und mechanische Einflüsse. Die Z-Linien haften am Sarkolemm. (93).

Zellmembranen bestehen zu 20 - 50 % der TS aus Lipiden (davon 45 - 65 % Phospholipide), zu 40 - 80 % der TS aus Eiweiß und zu 5 % der TS aus Kohlehydraten (28).

Sie regeln die Permeabilität, die Erregbarkeit, sowie Phago- und Pinozytose. Neuerdings wurden in der Zellmembran an Enzymen eine  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -abhängige ATPase, eine  $\text{Mg}^{++}$ -abhängige ATPase und eine NADH-Oxydoreduktase nachgewiesen.

### 2. Zytoplasma

Die Struktur des Zytoplasmas wurde unter dem Lichtmikroskop als Filarmasse, als Schaumstruktur, von Altmann schließlich als Granularstruktur beschrieben (158). Hürthle und Wach-

older hielten Zytoplasma für eine schematische Abstraktion (93). Das Paraplasma umfaßt Pigmente wie Myoglobin und Lipofuszin, Glycogengranula, Speicherfette, Sekretgranula und Proteine (158). Das Sarkoplasma der Muskelzelle befindet sich in vivo im Gelzustand, wechselt aber bei mechanischer Irritation in den Solzustand. Man bezeichnet dieses Phänomen als Thixotropie (33). Sarkoplasmareich sind die Fasern der roten Muskeln (165). Bei der Zellfraktionation wird es als "lösliche Fraktion" gewonnen (6). Das Zytoplasma fungiert als Vermittler des Stoffaustausches. An chemischen Reaktionen ohne Bindung an eine bestimmte Struktur können in ihm ablaufen: die Glycolyse, die Aminosäurenaktivierung und -verbindung mit t-RNA, der Pentosephosphatzzyklus, Fettsäuren- und Glutathion-synthese, der Abbau von Tryptophan und der Pyrimidine, sowie Reaktionen mit NADPH-verbundenen Dehydrogenasen.

### 3. Zellkern

Im Interphase- oder Arbeitskern wird die genetische Information gespeichert. Die Morphologie des Kerns ist aus der folgenden Abbildung 19 ersichtlich.

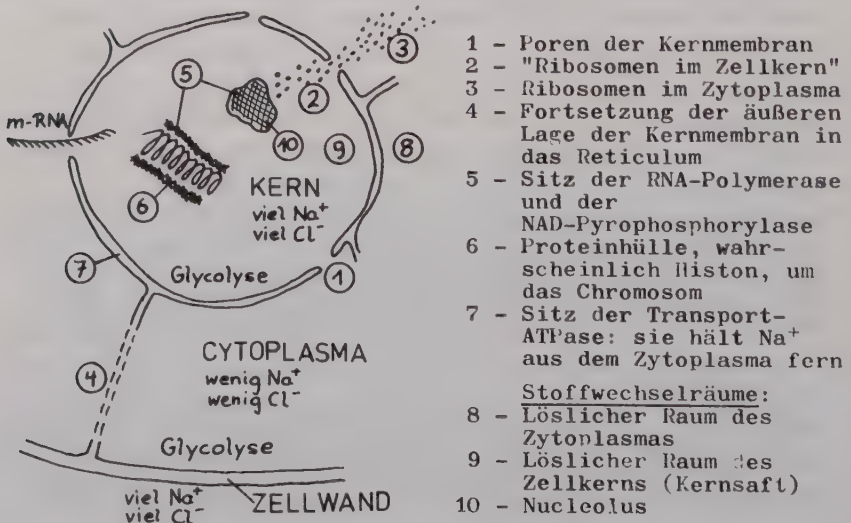


Abbildung 19: Substruktur des Zellkerns nach SIEBERT (271)

Skelettmuskelzellen sind als Plasmodium aufzufassen (158): die Kerne verteilen sich bis zu Hunderten an der Peripherie einer Faser, sind 10  $\mu$  lang und 5  $\mu$  dick, bläschenartig in der Form wegen ihrer Chromatinarmut, und weisen ein bis zwei Kernkörperchen auf.

Zellkerne bestehen zu 20 - 25 % der TS aus DNA. RNA liegt als t-, r-, m- und hochmolekulare RNA vor; die Relation DNA/RNA beträgt 0,15 - 0,22. Das Protein des Zellkernes macht ungefähr 70 - 75 % der TS aus; das Verhältnis Protein/DNA ist mit 5 angegeben. Es handelt sich um lösliches Protein einerseits und Histone, stark basische Proteine mit hohem Lysin und Arginingehalt, andererseits.

Die  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Konzentrationen sind fast die gleichen wie extrazellulär und 8 - 10 mal größer als im Zytoplasma.

Die Nucleoli enthalten in der TS 5 % RNA und 80 % Protein. Das DNA/RNA-Verhältnis beträgt 1,0 (271).

Der Zellkern fungiert als das Biosynthesezentrum der genetischen Informationen (271). An Enzymen wurden nachgewiesen die DNA-Polymerase, die DNA-abhängige RNA-Polymerase, die NAD-Pyrophosphorylase (NAD-Synthese im Kern) und Enzyme der Histonsynthese (176).

#### 4. Mitochondrien

Henle, Bowman und Kölliker beschrieben Mitte des vorigen Jahrhunderts "Interstitielle Granula"; Retzius bezeichnete sie 1881 als "Sarkosomen" und Regaud gab ihnen 1909 ihren heute gültigen Namen "Mitochondrien". (93). Bullard identifizierte sie 1912 mit Altmanns Bioblasten (149). Harman und Feigelson setzten die Muskelsarkosomen nach morphologischen und chemischen Gesichtspunkten den Mitochondrien gleich (107). Das morphologische Bild ist vielfältig; sie können auch verschmelzen (249). In der Idealzelle messen die Achsen des Mitochondrion 0,5 - 1,5  $\mu$ , in Leberzellen bis 3,3  $\mu$  und im Pankreas bis zu 10  $\mu$  (176). Besonders große Mitochondrien enthält der Flugmuskel des Wasserkäfers *Hydrophilus piceus*, d.h. spezialisierte Zellen enthalten immer auch eine große Zahl von Mitochondrien (213).

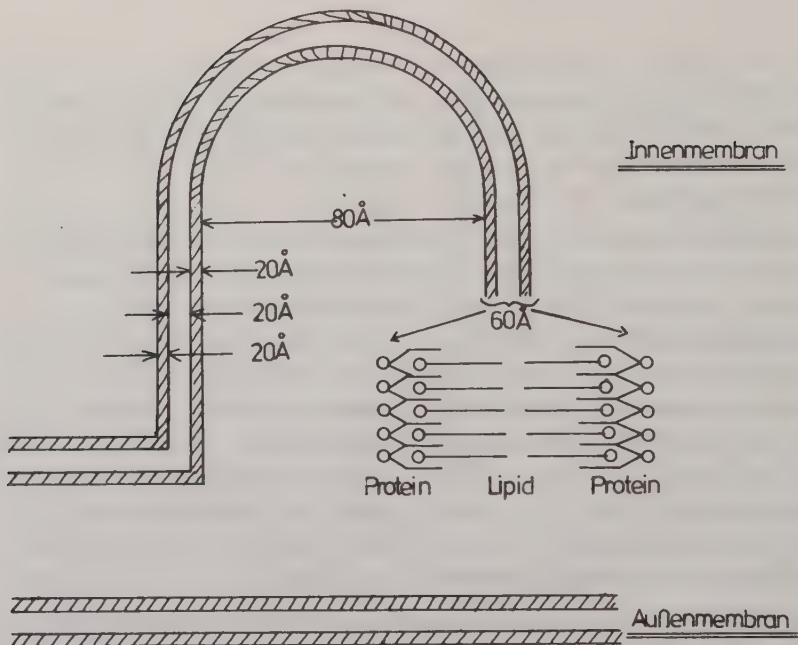


Abbildung 20: Crista mitochondrialis mit Diagramm des molekularen Aufbaues nach DEROBERTIS (249)

Im Elektronenmikroskop sieht man eine dünne Außenmembran und eine vielstrukturierte Innenmembran, die sich in Cristae und Tubuli auffaltet. An der Innenmembran haften die "elementary particles" nach Fernandez-Moran. In der Matrix, dem strukturlosen Inneren des Mitochondrion, stellen sich als Granula zweiwertige Ionen dar. Abbildung 20 informiert über den molekularen Aufbau einer Crista mitochondrialis.

#### Mitochondrien der Muskelzelle - Sarkosomen

Die Muskelmitochondrien liegen in meist regelmäßiger Anordnung, dicht mit Cristae gefüllt (213) mit der Längsachse zwischen den Myofibrillen, aber auch in Haufen bis zu Hundert, besonders in der Nähe der motorischen Endplatte. Im Herzmuskel sind die Mitochondrien besonders zahlreich - manchmal füllen sie mehr Raum als die Myofibrillen aus oder lagern dicht um den Zellkern (107).

Die Relation Mitochondrien/Myofibrillen ist Ausdruck der Leistung des Muskels. Muskeln mit Dauerleistung und geringer Kraftentwicklung, wie Herzmuskel und Flugmuskel, besitzen reichlich Mitochondrien. Angaben über Masse und Zahl der Mitochondrien in verschiedenen Geweben sind in Tab. 25 zusammengestellt. Über den Zusammenhang von Mitochondrien und Muskelfarbe informiert Tabelle 26.

Tabelle 25: Literaturangaben über die Masse und die Zahl der Mitochondrien in verschiedenen Geweben

| Gewebe, Tierart     | Zahl der Mitochondrien                   | Äutor |
|---------------------|------------------------------------------|-------|
| Herzmuskel, Ratte   | 53 % der Organmasse                      | 28    |
| Herzmuskel, Schwein | 30 % der Organmasse                      | "     |
| Herzmuskel, Hund    | Mitochondrien/Myofibrillen = 0,45        | "     |
| Skelettmuskel, Maus | $33,5 \times 10^8$ Mitochondrien pro g   | "     |
| Leber, Ratte        | 15 - 20 % der Organmasse                 | "     |
| "                   | 800 Mitochondrien pro Zelle              | 176   |
| "                   | 2500 " " "                               | 251   |
| "                   | $3,3 \times 10^{11}$ Mitochondrien pro g | "     |
| Leber, Taube        | 4,5 % der Organmasse                     |       |

Tabelle 26: Mitochondrien und Muskelfarbe

|                             | dunkle Muskelfarbe                                                                                                               | helle Muskelfarbe                                                                        |
|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| Zahl der Mitochondrien groß |                                                                                                                                  | gering                                                                                   |
| Muskelfunktion              | Dauerbelastung bei geringer Kraftentwicklung                                                                                     | kurze schwere Belastungen                                                                |
| Beispiele                   | Herz-, Zungen-, Augen- und Zwerchfellmuskel; M. soleus des Kaninchens; roter Seitenrumpfmuskel der Fische; Flugmuskel der Taube. | Brustmuskel des Huhnes; M. femoralis des Kaninchens; M. longissimus dorsi des Schweines. |

Neben den Mitochondrien kommen in der Muskelfaser mitochondrienähnliche "Teilchen von 0,5 u Größe" oder Sarkosomen vor. In ihnen wurde Nukleinsäure nachgewiesen. Floegel entdeckte die Teilchen im Jahre 1827 und Holmgren formulierte aus ihrer Lage eine Hypothese der Muskelkontraktion. Jordan verstand 1920 die kleinen Partikel als Vorstadien der Mitochondrien. Opie schlug als zusammen-

fassenden Terminus "Cytochondria" vor. KITIYAKARA und HARMAN (149) bezeichnen die kleinen Partikel als Sarkosomen, einem Ausdruck, der vorher für Muskelmitochondrien verwendet worden war. Die Unterschiede zwischen Muskelmitochondrien und Sarkosomen veranschaulicht Tabelle 27.

Tabelle 27: Unterschiede zwischen Muskelmitochondrien und Sarkosomen nach Kitiyakara und Harman (119, 149, 108)

| Eigenschaft                      | Muskelmitochondrien                 | Sarkosomen       |
|----------------------------------|-------------------------------------|------------------|
| Größe                            | 1 - 10 $\mu$                        | 0,1 - 0,3 $\mu$  |
| Form                             | variabel                            | rund, elliptisch |
| Orientierung zu den Myofibrillen | parallel                            | transvers        |
| Osmotisches Schwellen            | +                                   | -                |
| Oxydationsrate                   | +++                                 | + -              |
| Respirationskontrolle            | +++                                 | + -              |
| ATPase stimuliert durch          | Mg <sup>++</sup> ,<br>Dinitrophenol | Mg <sup>++</sup> |

Bei der chemischen Zusammensetzung der Mitochondrien erscheint vor allem bemerkenswert, daß RNA und DNA in Mengen um circa 1 % des Mitochondrienproteins nachgewiesen worden ist. Sie garantieren dieser Organelle eine gewisse Selbständigkeit in der "Zellhierarchie" (28, 204, 271) und synthetisieren spezifische Membranproteine (173). Die Mitochondrienmembran enthält einen höheren Phospholipidanteil als andere Zellmembranen (102).

Das Absorptionsspektrum der Matrix entspricht den Cytochromen a, b und c (54). Ein kontraktiles Protein befähigt die Mitochondrien zu wurmartigen Bewegungen (158). Cardiolipin ist ein für diese zelluläre Substruktur typisches Lipid. Die Lipidzusammensetzung der Mitochondrienmembran wird von HALLERMAYER und NEUPERT (95) wie folgt angegeben: Die Außenmembran enthält 59 % Lipid und 41 % Protein (Phospholipid und Ergosterol), die Innenmembran 23 % Lipid und 77 % Protein (Cardiolipin).

Das Gewicht eines Mitochondrion beträgt bei Bezug auf Frisch-

substanz  $1,3 \times 10^6$  Dalton, bezogen auf Trockensubstanz  $1,1 \times 10^{-13}$  g (176); der Stickstoffanteil beläuft sich auf  $2,23 \times 10^{-14}$  g (294).

Funktionell kann das Mitochondrion als Multienzymkomplex aufgefaßt werden, der aus mehreren Tausend Elementarkomplexen besteht. Diese lenken den biochemischen Abbau nun auch morphologisch gesehen in eine gemeinsame Bahn und bestehen aus dem primären Dehydrogenasekomplex (a), Elektronentransportartikeln (b) und Strukturprotein (c) (268). An der Mitochondrienaußenmembran wirken Enzyme des Zitratzyklus (14), der Beta-Oxydation und der Pyruvatdehydrogenase-Komplex, sowie Mechanismen der Permeabilitätskontrolle (14, 176). Für einige Stoffe wirken Passagemechanismen, Fettsäuren werden z.B. als Carnitinester eingeschleust (272). An der Innenmembran verlaufen der Elektronentransport und die oxydative Phosphorylierung (14). Oxydative Energie wird überführt in mechanische als Kontraktionskraft der Mitochondrien, in osmotische für die Ionenpumpe und in chemische als ATP. Weitere Enzyme der Innenmembran sind Succinat-DH (14, 341) und ATPase (14). Nach DE ROBERTIS (249) sind in der Matrix Enzyme des Krebszyklus und der Betaoxydation, und in den Membranen die der Atmungskette lokalisiert. Nach ELBERS (73) befindet sich Citrat innerhalb, Malat außerhalb des Mitochondrions; das Verhältnis ATP/ADP ist in den Mitochondrien niedrig. An weiteren Enzymsystemen sind die Reaktionen der Hämsynthese und des Harnstoffzyklus zu erwähnen.

AZZONE (12) beschreibt Unterschiede in der Funktion der Mitochondrien verschiedener Organe und Tierarten. Mg-stimulierte ATPase kommt z.B. nur in Muskelmitochondrien vor. Sie ist im Gegensatz zu der Myosin-ATPase atebinempfindlich. Dinitrophenol entkoppelt die oxydative Phosphorylierung, was durch Serumalbumin normalerweise verhindert wird.

## 5. Lysosomen

Sie kommen in allen Zellen vor und zeigen keine einheitliche Morphologie. Zum Nachweis dient ihre - heterogene - Fermentausrüstung (20). Elektronenoptisch wurden Lysosomen in der Muskelfaser bisher nicht mit Sicherheit abgebildet (161).

Die mutmaßliche Entstehung der Lysosomen ist in Abbildung 21 dargestellt: Die von den Ribosomen synthetisierten Enzyme werden von den Golgi-Membranen zu Lysosomen geformt.

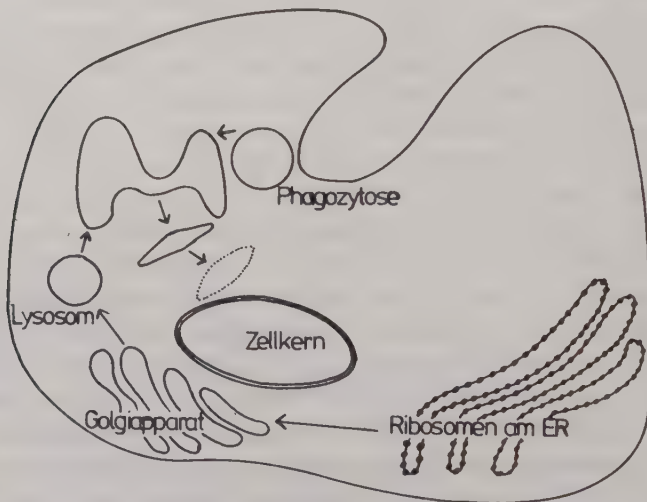


Abbildung 21: Mutmaßliche Entstehung der Lysosomen und die Zellphagozytose (128)

Sodann werden Nahrungsvakuolen mit den phagozytierten Partikeln und zugleich den verdauenden Enzymen gebildet.

In vivo bewerkstelligen die Lysosomen also die Phagozytose mit intrazellulärer Verdauung. Post mortem leiten sie den Abbau der Eiweiße bei saurem pH-Wert ein. Kathepsin soll bei der Fleischreifung als Tenderizer wirken (217, 223, 281). Über die in den Lysosomen nachgewiesenen Enzyme informiert Tabelle 28. (Seite 71).

Die Größe dieser Zellorganellen schwankt von gerade sichtbar bis  $2\mu$ , maximal  $5\mu$  (28), im allgemeinen beträgt sie  $0,5 - 0,8\mu$  (110). Eine einfache Lipoproteidmembran umgibt sie. Der nicht-enzymatische Anteil der Lysosomen zeigt in Protein- Phosphor- und Lipidverteilung Ähnlichkeiten mit den Mitochondrien (244, 279).

Tabelle 28: Enzyme in Lysosomen (28, 272)

| Enzym                                                                                                                                          | Substrat           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| saure RNase<br>saure DNase<br>saure Phosphatase<br>Phosphoproteidphosphatase                                                                   | Nukleinsäuren      |
| Kathepsin<br>Kollagenase                                                                                                                       | Protein            |
| $\alpha$ -Glucosidase                                                                                                                          | Glycogen           |
| $\beta$ -N-Acetylglucosaminidase<br>Hyaluronidase<br>$\beta$ -Glucuronidase<br>$\beta$ -Galaktosidase<br>$\beta$ -Mannosidase<br>Arylsulfatase | Mucopolysaccharide |
| Lipase<br>unspezifische Esterase                                                                                                               | Lipide             |

## 6. Mikrobodies

Die Mikrobodies oder Peroxysomen wurden in Leberzellen als Uricase enthaltende Partikel nachgewiesen und sind 1  $\mu$  groß. Sie stehen morphologisch den Lysosomen nahe (9). Ein konzentrisch lamellärer Innenkörper wird im Elektronenmikroskop sichtbar (272). Die Mikrobodies gelten als Urform der Mitochondrien bei der Zellatmung und verfügen über einen eigenen Respirationstyp, den die Reaktionsgleichung  $O_2 \longrightarrow H_2O_2 \longrightarrow 2 H_2O$  wiedergibt (66). Enzyme dieser Organellen sind Uricase (Urat oxydase), D-Aminosäureoxydase, Katalase, Enzyme des Purinabbaues und des Glyoxylatzyklus (128, 176, 272).

## 7. Endoplasmatisches Reticulum (ER)

Das Membransystem des ER gliedert das Zytoplasma in ein Zweiphasensystem. Es bildet einerseits die Kernmembran und hat andererseits Verbindung zum Extrazellulärraum (28). Der Durchmesser der Tubuli und Zisternen beträgt 50 - 150 nm (93). Die Membranen des ER sind glatt begrenzt (smooth surface) und nicht basophil (28, 93, 272). Ergastoplasma ist die granuläre und rauhe Form als spezialisierter Teil

des ER. Wegen des Gehaltes an Ribonukleoprotein (Malade-Granula, Ribosomen) reagiert es basophil (28). Unter Mikrosomen versteht man eine Fraktion bei der Zentrifugation von Zellorganellen. Diese morphologisch, wie chemisch. heterogene Fraktion enthält Teile des ER, des Ergastoplasmas, Bruchstücke von Mitochondrien-, Zell- und Kernmembranen, des Golgiapparates und Zentriols, sowie Ribosomen, Lysosomen und Mikrobodies. Das Sarkoplasmatische Reticulum ist das ER der Muskelzelle. Es besteht zum größten Teil aus glatten Membranen. Die 5 nm starken, zweischichtigen Membranen bilden "Sarkotubuli" von 20 - 30 nm Durchmesser. In der Anordnung wird ein transversales oder T-System, sowie ein I- und A-System unterschieden (29, 93, 223).

Das ER besteht zu 40 - 50 % aus Lipiden, davon 60 % Phosphatide, und zu 50 - 60 % aus Proteinen. Zellmembran und ER sind ähnlich aufgebaut.

Das Sarkoplasmatische Reticulum beinhaltet den Erschlaffungsfaktor, der die  $Ca^{++}$ -Konzentration an den Myofibrillen steuert (93). Der Inhalt des SR ist möglicherweise mit dem extrazellulären Raum verbunden (29). Das ER wirkt als Überträger im Stoff- und Ionentransport; so werden vom Ribosom synthetisierte Proteine an ihren Bestimmungsort gebracht. Vielleicht stellt das ER die Vorstufe des Golgiapparates dar (176). Im Membranteil des Reticulums verläuft die Synthese von Mucopolysacchariden, Steroiden, Phospholipiden und Glucuroniden, der Abbau und Umbau von Sterinen, die Hydroxylierung einer Vielzahl von Arzneimitteln und anderer organischer Moleküle nach der Gleichung  $DH_2 + NADH + H^+ \rightarrow DHOH + NADH^+ + H_2O$ , ferner eine Redoxkette nach der Gleichung  $NADH \xrightarrow{\text{Cytochrom } b_5} O_2$ .

### 8. Ribosomen

Sie sind die kleinsten bisher bekannten Organellen überhaupt. Ihr Gewicht beträgt zwischen 2,6 und  $4,0 \times 10^6$  Dalton (28, 176). Die Anzahl der Ribosomen ist in der Zelle

proportional der Zell-RNA und der Basophilie; sie beträgt im Kaninchenreticulozyt 100 Ribosomen/ $\mu^3$  oder  $10^5$  Ribosomen/Zelle. Beim Zentrifugieren zerfällt das Ribosom der Säugetiere (80 S Partikel) in ein 50 - 60 S und ein 30 - 40 S Partikel (28). Diese in der ganzen Natur einheitliche Substruktur wird durch das  $Mg^{++}$ -Ion (176) oder das  $Zn^{++}$ -Ion (291) stabilisiert. Jede Untereinheit besteht aus einem einzigen Molekül rRNA und aus stark basischen Proteinen. Funktion des Ribosoms ist die Proteinsynthese. Ribosomen können dabei an einem Strang mRNA anlagern und so Polysomen bilden (28).

### 9. Golgiapparat

Der "apparato reticulare interno" nach C. Golgi soll in allen Zellen (28) in Kernnähe (158) oder in der Gegend der Zentrosomen (176) vorkommen. Wie das ER besteht er aus Zisternen und Vakuolen. Als eigene Zellorganelle wird er wegen der glatten Membranen (20 - 30 Å) u. der eigenständigen biochemischen Rolle beschrieben (110). Die Elemente des Golgiapparates sind die Dictyosomen, die Organellen der Sekretkondensation (191).

Histochemisch wurden Fettsäuren, Lipide und Ascorbinsäure gefunden. Die Funktion dieser zellulären Substruktur besteht in der Speicherung von in den Ribosomen gebildeten Proteinen (128), der Bereitstellung von Zymogengranula (158), der (neuerdings bestrittenen) Vitamin C Speicherung (28, 158) und in der Umgrenzung der Lysosomenenzyme (128).

### 10. Zentriolen

Sie liegen, von einer hellen Sphäre umgeben, in der Ein- oder Zweizahl (Diplosomen) am Kernpol. Ihre Größe beträgt 300 - 500 nm, ihr Durchmesser 150 nm. Die Zentriolen bilden den Spindelapparat der Mitose (158).

## 2. Zellorganellen und Fleischkunde

Veränderungen des Fleisches bei der technologischen Behandlung manifestieren sich auch, vermutlich originär, an den Zellorganellen. Es ist denkbar, daß Prozesse wie Gefrieren oder Bestrahlen hier Membrane verändern, Enzyme freisetzen und auf diese Weise die Qualität des Fleisches und der daraus hergestellten Erzeugnisse beeinflussen.

Für die Fleischqualität wichtige Systeme des Sarkoplasmas sind: 1) Enzyme der Glycolyse regeln die Milchsäureproduktion, den postmortalen pH-Verlauf und damit den Hydratationszustand der Muskulatur; 2) das Myoglobin; 3) das ATP, das die Wasserbindung und die Löslichkeit des Aktomyosins beeinflusst. Die beim Abbau entstehende Inosinsäure ist an der Geschmacksbildung des Fleisches beteiligt, und 4) Minerale und Spurenelemente.

Zellkerne sind vermutlich ohne Bedeutung für die Fleischqualität (161). Die Wasserstoff-übertragenden Enzyme der Mitochondrien beeinflussen die Redoxlage des Gewebes und damit Fleischfarbe, Mikrobenwachstum und Umröten beim Pökeln: Mitochondrien vermögen Nitrit zu Stickoxid zu reduzieren (161). Nach Gefrieren und Tauen kann ein Isoenzym der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase im Zytoplasma nachgewiesen werden (161). Mitochondrienenzyme katalysieren die Reaktion von Oxy-myoglobin zu Metmyoglobin. Bei Entfernung mehrwertiger Kationen tritt eine Hemmung ein. Mitochondrien liefern ATP, das als Weichmacher die Löslichkeit des Aktomyosins erhöht.

Lysosomenenzyme werden durch Gefrieren und Tauen aktiviert (141, 217). Kathepsin wirkt als Zartmacher mit einem Optimum seiner Wirkung bei pH 5,5 (217, 278). Die rasche Verderblichkeit von aufgetautem Gefrierfleisch kann mit einer Schädigung der Lysosomenenzyme zusammenhängen (217). Vielleicht beeinflusst das Netzwerk des Sarkoplasmatischen Reticulums das Wasserbindungsvermögen unbehandelten Fleisches oder auch die Zartheit (161). Vor allem für die Fleischverarbeitung wichtig ist der Umstand, daß der

Erschlaffungsfaktor noch geraume Zeit nach dem Schlachten erhalten bleibt, d.h. der Rigor mit Abnahme der Wasserhaltefähigkeit verzögert eintritt. Vielleicht steht der rasche Eintritt der Glycolyse, wie es beim Schweinefleisch vorkommt, damit in Zusammenhang. Auch der Tau-Rigor könnte auf eine Inaktivierung des Erschlaffungsfaktors zurückgehen (161).

### 3. Zellfraktionation im Schwerkraftfeld

Miescher isolierte 1869 Zellkerne, Behrens führte 1932 die erste systematische Fraktionation durch. Pioniere in den letzten drei Jahrzehnten waren Anderson, Brachet, Claude, DeDuve, Hogeboom, Kielley, Palade und Schneider. Weitesten Anwendung für eine Zellfraktionation im Schwerkraftfeld hat das "four-step-fractionation-scheme" gefunden. Die Zellbestandteile werden dabei nach ihrer unterschiedlichen Sedimentationsgeschwindigkeit getrennt (4, 29, 57, 126, 149, 176, 149, 272). Die 1. Fraktion, die sogenannte nukleäre Fraktion, enthält im wesentlichen die Zellkerne. Verunreinigungen sind ganze Zellen, Gewebedebris, anhaftendes Zytoplasma, Erythrozyten. Die 2. Fraktion beinhaltet die großen Granula, also Mitochondrien, an Verunreinigungen Lysosomen. Die 3. Fraktion, die Fraktion der kleinen Granula oder mikrosomale Fraktion umfaßt Ribosomen, Mikrosomen (Ergastoplasma), Mikrobodies, Golgiapparat, Zentriolen, Lysosomen, Membranfragmente von Zellkern- und ER-Membranen. Verunreinigungen bestehen aus löslichen Proteinen, die wegen des hohen RNA-Gehaltes dieser Fraktion adsorbiert werden. Die "lösliche" 4. Fraktion besteht aus dem Überstand und enthält die löslichen Proteine des Zytoplasmas.

Zur Überprüfung der Reinheit der Fraktionen eignet sich das Lichtmikroskop zu Schnelltests; in nicht exakt gebrochene Zellen kann der Farbstoff Kristallviolett nur langsam eindringen. Zur Identifizierung von Zellkernen und zytoplasmatischen Verunreinigungen eignet sich die Hämatoxylin-Eosin-

Tabelle 30: Für Zellfraktionen typische Enzyme und andere Substanzen als Indikatoren und Monitoren (4, 271, 176)

| Zellfraktion               | Leitsubstanz                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Zellkerne                  | DNA<br>NAD-Pyrophosphorylase<br>NMN-Adenyltransferase<br>DNA-abhängige RNA-Polymerase                                                                                                                                                                                                                              |
| Mitochondrien              | Glutamat-DH (32, 73)<br>Malat-DH<br>$\alpha$ -Ketoglutarat-DH<br>Pyruvat-DH<br>Cytochromoxydase, NADH-Oxydase<br>Succinat-DH (färbt Tetrazolium) (341)<br>Pyruvatcarboxylase<br>$Mg^{++}$ - und Dinitrophenol-abhängige ATPase<br>"alkalische" DNase und RNase<br>Monoamin- und Diaminoxidase<br>Cu<br>Cardiolipin |
| Lysosomen                  | saure Phosphatase, RNase, DNase<br>$\beta$ -Glucuronidase<br>$\beta$ -Galactosidase<br>$\beta$ -Mannosidase<br>Kathepsin                                                                                                                                                                                           |
| Mikrobodies                | Katalase<br>D-Aminosäureoxydase                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| Ribosomen                  | RNA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Reticulum,<br>Golgiapparat | Glucose-6-Phosphatase<br>NADH-Cytochrom c - Reductase<br>(60 % in den Mikrosomen, 40 % in<br>den Mitochondrien)<br>Nucleosid-Diphosphatase<br>NADPH-O <sub>2</sub> -gebundene Oxydasen<br>Cytochrom b <sub>5</sub> und damit verbundene<br>Cytochrom c Reductase                                                   |
| Lösliches<br>Cytoplasma    | Glucose-6-Phosphat-DH<br>Transaldolase, Transketolase<br>$\alpha$ -Glycerolphosphat-DH<br>Phosphofructokinase<br>Acetyl-CoA-Carboxylase<br>Aminoacyl-tRNA-Synthetase<br>Lactat-DH, (Malat-DH)                                                                                                                      |

Färbung, für Mitochondrien Janus Grün B (165) und Tetrazolium (NitroBT) (213, 341). Lichtmikroskopisch ist in der mikrosomalen Fraktion nur die Abwesenheit größerer Teilchen zu erkennen, eine Überprüfung dieser heterogenen Fraktion gestaltet sich auch im Elektronenmikroskop schwierig (272). Weitere Möglichkeiten einer Überprüfung des Reinheitsgrades erhaltener Zellfraktionen bietet die chemische Untersuchung. So findet sich DNA nur im Kern; ihr Nachweis kann mit der Feulgen-Färbung, mittels UV-Spektrophotometrie erfolgen (80). RNA weist man in der mikrosomalen Fraktion mit Hilfe der Orcinolreaktion nach. Myoglobin ist nur im Sarkoplasma, nicht in den Kernen, Hämoglobin dagegen teils auch in den Kernen nachweisbar. In Tab. 30 (Seite 76) sind Substanzen und Enzyme, die als Indikatoren und Monitoren Verwendung finden, zusammengestellt. Grobe Fehler können durch die Berechnung der "balance sheet", d.h. der Ermittlung der Substanzmenge in den Fraktionen (a) und der Rekonstruktion des Homogenates (b) entdeckt werden.

#### 4. Technik der Fraktionation

Die Fraktionation besteht in den Schritten Zerbrechen der Zelle (1), Wahl des Suspensionsmediums (2) und Separation der Partikel (3).

##### 1. Zerbrechen der Zelle

, Grundsätzlich bieten sich dafür mechanische, chemische und enzymatische Möglichkeiten an. Mechanische Techniken (4) benutzen schneidende Kräfte (Mixer, Ultraturrax, Waring Blendor), scherende Kräfte (Gewebemühle, Gerät nach Potter-Elvehjem), Gefrieren und Tauen, osmotische Wirkungen, Ultraschallbehandlung oder Pressen durch Lochscheiben. Ein coaxial rotierender Homogenisator, der in jedem Labor verwendbar ist, ist das Gerät nach Potter und Elvehjem: ein Teflonstempel rotiert dabei in einem etwas größeren Glasrohr. Der Anteil der gebrochenen Zellen hängt von der Drehgeschwindigkeit und vom Raum zwischen Mantel und Stempel ab. Als Nachteil wäre anzuführen, daß viele Zellen unversehrt bleiben und daß klumpendes Bindegewebe mittels einer Lochplatte ent-

fernt werden muß.

Der Waring Blendor und andere high-speed-mixer sind zwar nach Messerschärfe und Geschwindigkeit vielseitig anwendbar, doch werden dabei Organellen unkontrollierbar beschädigt. Außerdem können lokale Erhitzungen auftreten (4,61). Grobe Gewebedebris, Aktomyosinklumpen und Bindegewebe können mit Gaze, Käsetuch oder Sieben abgetrennt werden. AZZONE (12) erhielt bei Anwendung verschiedener Homogenisierungsmethoden gleiche Mitochondrienausbeuten (Mörser mit Quarzsand, Potter-Elvehjem, Waring Blendor, einfaches Zerquetschen).

## 2. Suspensionsmedium

Zur Homogenisation von Gewebe und als Träger der Organellen dienen Medien verschiedener Zusammensetzung und Osmolarität (107, 119, 125). Häufig werden wässrige Medien beschrieben: 1) Zitronensäurelösung ist für die exakte Gewinnung unverletzter Kerne geeignet; allerdings werden auch Proteine und Minerale extrahiert. 2) Zuckerlösungen werden, meist isoton, für Mitochondrienisolationen verwendet (76, 125). 3) Salzlösungen finden bei der Muskelfraktionierung Anwendung. Im Nichtelektrolytmedium wird Muskelgewebe nämlich gelatinös (76). Salzlösungen bringen die besten Mitochondrienausbeuten (12, 54, 119, 273).

An Zusätzen zum Medium bewährten sich Puffer, wie TRIS-, Bicarbonat- und Phosphatpuffer, Albumin,  $Mg^{++}$ , EDTA und ATP (Extrazelluläre Ca-Ionen bringen ohne diese Zusätze Mitochondrien zum Schwellen) (176, 256, 273, 266).

In wässrigen Medien besteht die Gefahr, daß Stoffe extrahiert, transportiert und von anderen Partikeln adsorbiert werden. In Salzlösungen werden z.B. salzlösliche Proteine zum Teil extrahiert (161); ferner bilden sich Partikelklumpen (4). Relevante Ergebnisse erhält man nur bei Anwendung verschiedener Medien.

Bei der Fraktionation in nichtwässrigen Medien werden die Zellen lyophilisiert, sodann im Medium gelöst und zerkleinert. Mischungen aus Äther, Chloroform,  $CCl_4$  und Cyclohexan gestatten Arbeiten im Dichtegradienten (73).

### 3. Separation der Partikel

Im Schwerkraftfeld separieren die Teilchen nach Unterschieden in Größe, Form, Dichte und eventuell nach Oberflächenladung sowie Löslichkeit. Bei der Vier-Schritt-Fraktionation werden die Zentrifugate nach Einwirkung einer definierten Zentrifugalkraft in der Zeit gesammelt. Die physikalische Formel der Sedimentation geht von einer Verteilung gleicher Partikel in einem Medium aus. Das Stokes' Gesetz für die Sedimentation eines runden Teilchens lautet:

$$t = \frac{9 \cdot \eta}{2 \cdot \omega^2 \cdot r^2 \cdot (d_p - d_m)} \ln \frac{x_{\max}}{x_{\min}}$$

wobei  $\eta$  die Viskosität,  $r$  den Teilchenradius,  $d$  die Dichte von Partikel und Medium,  $x$  den Abstand von der Drehachse und  $\omega$  die Winkelgeschwindigkeit bezeichnet. Sedimentations-Maßeinheit ist das Svedberg (s), für 20°C ( $s_{20}$ ). Es ist definiert als Sedimentationsgeschwindigkeit bezogen auf die Einheit der Zentrifugalbeschleunigung, hat die Dimension einer Zeit und ist Konstante des sedimentierenden Partikels. In der Formel ergibt sich  $s = \frac{dx/dt}{\omega^2 \cdot x} [s]$ ;  $1s = 10^{-13} \text{ sec.}$

Über die Dichte von Substanzen und Organellen in Zuckerlösung (0,25M) informiert Tabelle 31 (Seite 79). Weiter sind Beispiele von Zentrifugalkraft und -zeit bei der Fraktionation von Leber- und Nierenzellen in Tabelle 32 (Seite 80) zusammengestellt.

Tabelle 31: Dichte von Substanzen und Organellen in Zuckerlösung (0,25M); Mediumdichte ( $0^\circ$ ) 1,0339; Mediumviskosität. ( $0^\circ$ ) 2,31 (28,176)

|                | Dichte | Sedimentationskonst. |
|----------------|--------|----------------------|
| Zellkern - DNA | 1,75   |                      |
| - Protein      | 1,188  |                      |
| Mitochondrien  | 1,099  | $1 \times 10^4$      |
| Lysosomen      | 1,101  |                      |
| Mikrobodies    | 1,09   |                      |
| Ribosomen      | 1,6    | 60 - 80              |

Tabelle 32: Beispiele von Zentrifugalkraft und -zeit bei der Fraktionation von Leber- und Nierenzellen

| Gewebe            | Medium                      | Zellkern-<br>fraktion |         | Mitoch.-<br>fraktion |         | Mikros.<br>Fraktion |     | Autor/Jahr |
|-------------------|-----------------------------|-----------------------|---------|----------------------|---------|---------------------|-----|------------|
|                   |                             | g                     | t(Min.) | g                    | t(Min.) | g                   | t   |            |
| Leber,<br>Ratte   | Zucker<br>hyperton          | 1900                  | 5       | 24000                | 30      | -                   | -   | 170/52     |
| Lb,Niere<br>Ratte | NaCl<br>+ Zucker            | 1000                  | 15      | 5000                 | 30      | -                   | -   | 61/53      |
| Lb,Niere<br>Ratte | Zitrat                      | 880                   | 10      | -                    | -       | -                   | -   | 80/53      |
| Leber,<br>Ratte   | Zucker                      | 700                   | 10      | 5000                 | 10      | 54000               | 60  | 4/59       |
| Leber,<br>Ratte   | Zucker                      | 600                   | 10      | 6000                 | 10      | -                   | -   | 12/60      |
| "                 | "                           | 800                   | 15      | 9000                 | -       | -                   | -   | 169/61     |
| Leber,<br>Ratte   | Zucker<br>MgCl <sub>2</sub> | 600-<br>700           | -       | -                    | -       | -                   | -   | - /67      |
| Leber,<br>Huhn    | KCl                         | 1000                  | 10      | 15000                | 10      | 105000              | 180 | 206/69     |
| Leber,<br>allgem. | Zucker                      | 700                   | 10      | 7000                 | 10      | 105000              | 60  | 176        |
| "                 | "                           | 600                   | 10      | 15000                | 5       | -                   | -   | 76/67      |
| Tumor-<br>zellen  | Zucker<br>Ca                | 880                   | 10      | 21000                | 30      | 105000              | 60  | 193/61     |
| Allgem.           | Zucker                      | 700                   | 10      | 5000                 | 10      | 54000               | 60  | 249/65     |

## 5. Fraktionation von Muskelzellen

Die unterschiedliche Ausstattung der Muskelfaser mit Myofibrillen und Mitochondrien erschwert die Anwendung einheitlicher Fraktionsationsbedingungen. Nach HASSELBACH (112) enthält der Muskel dreimal soviel Myosin wie Aktin und achtmal soviel Myosin wie Grana.

Erste Arbeiten über die Isolierung von Muskelmitochondrien stammen von Keilin, Hartree und Stern um 1939. In der Folge gewannen HARMAN und FEIGELSON (107), KITIYAKARA (149), CHAPPELL und PERRY (54) Mitochondrien aus dem Taubenbrustmuskel. Fraktionierung von Muskelproben des Menschen führten ERNSTER (75, 76) und AZZONE (12) durch. Am Rattenmuskel arbeiteten KLINGENBERG und HEDMAN (119, 151). WESTER (332)

analysierte die Fraktionen von Rinderherzmuskel auf TS und Protein. Über die technische Handhabung und über die Ergebnisse geben die Tabellen 33 und 34 (Seite 81 und 82) Auskunft.

Tabelle 35: Beispielhafte Angaben von g, t(Minuten) und Medium bei der Vier-Stufen-Fraktionation von Muskelzellen

| Gewebe                         | Medium                          | Nucleo<br>myofibr. |          | Mitoch.<br>Frakt. |               | Mikros.<br>Fraktion |    | Autor |
|--------------------------------|---------------------------------|--------------------|----------|-------------------|---------------|---------------------|----|-------|
|                                |                                 | g                  | t        | g                 | t             | g                   | t  |       |
| Tauben-<br>brust-<br>muskel    | Zucker                          | 600                | 5        | 3500              | 10            | -                   | -  | 54    |
|                                | " ,NaH<br>CO <sub>3</sub>       | 800                | 10       | 3000              | 15            | -                   | -  | 108   |
|                                |                                 |                    |          | 4400              | Sarkosomen    |                     |    |       |
| "                              | "                               | 500                | 15       | 2250              | 15            | -                   | -  | 149   |
| "                              | Zucker                          | 220                | 10       | 4500              | 7             | -                   | -  | 12    |
| "                              | Tris-<br>KCl                    | 600                | 5        | 8000              | 10            | -                   | -  | 54    |
| "                              | "                               | 600                | 5        | 8000              | 10            | -                   | -  | 76    |
|                                |                                 | -650               | -10      |                   |               |                     |    |       |
| Kaninch.<br>Muskel             | KCl                             | 1000               | -        | 60.000            | -             | -                   | -  | 112   |
| Hamster<br>und Ratte<br>Muskel | Zucker                          | 600                | 5        | 3500              | 10            | -                   | -  | 54    |
| Ratte<br>Muskel                | Tris-<br>KCl                    | 650                | 10       | 3500              | 10            | -                   | -  | 119   |
| "                              | "                               |                    |          |                   |               |                     |    |       |
|                                | Zucker<br>EDTA                  | 250                | 12       | 9000              | 10            | -                   | -  | 151   |
| Mensch u.<br>Ratte<br>Muskel   | Tris-<br>KCl                    | 600-<br>650        | 5-<br>10 | 14000             | 10            | -                   | -  | 76    |
| Mensch<br>Muskel               | "                               | 2500<br>rpm        | 5        | 10000<br>rpm      | 10            | -                   | -  | 75    |
| Muskel<br>allg.                | Zucker                          | -                  | -        | 3000-<br>10000    | Mitochondrien |                     |    |       |
|                                |                                 |                    |          | 20000             | Lysosomen     |                     |    |       |
|                                |                                 |                    |          |                   |               | 100.000             | -  | 161   |
| Rind<br>Herz                   | Zucker                          | 500                | 10       | 10000             | 20            | 105.000             | 60 | 332   |
| "                              | "K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 1800<br>rpm        | 10       | 50000<br>rpm      | -             | -                   | -  | 126   |
| Kaninch.<br>Herz               | KCl, NaF                        | 800                | 2        | 18000             | 15            | -                   | -  | 171   |

Tabelle 34: Ergebnisse der Fraktionation von Muskelzellen: Organellen und einige Enzyme bei der Vier-Stufen-Fraktionation (12, 107, 151)

| Fraktion                      | Partikel                                                                         | Enzyme                                        |
|-------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Nukleo-myofibrilläre Fraktion | Gewebedebris, ganze Zellen, Kerne, salzlösl. Proteine, Bindegewebe, Erythrozyten | Ca-aktivierte ATPase<br>Adenylsäure-deaminase |
| Mitochondrien Fraktion        | Mitochondrien, Lysosomen, Partikel von 0,5 u                                     | Mg-aktivierte ATPase<br>Myokinase (75)        |
| Mikrosomen-Fraktion           | SR, Ribosomen, Bruchstücke der Zellmembranen, Lysosomen                          | Marsh-Bendall-Faktor                          |
| Lösliche Fraktion             | Lösliche Proteine                                                                | Glycolyseenzyme                               |

#### 6. Bezugsgrößen von Mineralien in den Zellfraktionen

Der Bezug des Spurenelementes Zink auf die Größen der Rohnährstoffanalyse gilt als "grobes Handwerkszeug". Ein Vergleich mit näher definierten Gruppen ergäbe eher physiologische Hinweise auf die Zinkbindung. Die größte biochemische Bedeutung kommt noch dem Bezug auf Protein zu; die genauesten Werte ergeben sich beim Bezug auf Asche (293). Möglichkeiten sind: a) die Konzentrationsangabe in der subzellulären Fraktion (121, 332), z.B.

$$\frac{\mu\text{g Zn in der Fraktion}}{\text{g N in der Fraktion}};$$

b) die relative spezifische Aktivität nach DeDuve, die eine prozentuale Verteilung, bezogen auf die N-Verteilung angibt und formuliert wird als 
$$\frac{\mu\text{g Zn/g N (in der Fraktion)}}{\mu\text{g Zn/g N (im Homogenat)}} = \frac{\% \text{ Zn des Homogenates in der Fraktion}}{\% \text{ N des Homogenates in der Fraktion}};$$

c) die prozentuale Verteilung des Zinks in den Fraktionen, z.B. Mitochondrien enthalten x % des Gewebezinks (332);

d) die Molarität aus dem Volumen des Rückstandes und der Konzentration des Metalles und e) bei Verwendung von Zink-65 die Beziehung Aktivität des Zn-65/g N (18).

abelle 35: Ergebnisse an Zellprotein, -TS, -Asche, -Lipid, -RNA, -DNA  
nd Phosphor bei der 4-Stufen-Fraktionation.  
bsolute Werte: mg Substanz in der Fraktion aus 1 g Organ  
relative Werte: Prozentuale Verteilung einer Substanz

| Probe                                                    | Kern-<br>Fraktion | Mitochondr.<br>Fraktion     | Mikros.<br>Fraktion | Lösl.<br>Fraktion | Autor               |
|----------------------------------------------------------|-------------------|-----------------------------|---------------------|-------------------|---------------------|
| =====                                                    |                   |                             |                     |                   |                     |
| <u>PROTEIN: mg aus 1 g Organ bzw. % des Zellproteins</u> |                   |                             |                     |                   |                     |
| <u>in der Fraktion</u>                                   |                   |                             |                     |                   |                     |
| Leber, Ratte                                             | 10-15%            | 20-25%<br>(Lysosomen<br>5%) | 20%                 | 30%               | MAHLER (176)        |
| Leber, Ratte                                             | -                 | -                           | 20%                 | -                 | BIELKA (28)         |
| "                                                        | -                 | 33%                         | 22%                 | 45%               | HOGEBOM (125)       |
| "                                                        | 19mg              | 5mg                         | 4mg                 | 11mg              | THIERS (293)        |
| "                                                        | 44%               | 12%                         | 11%                 | 28%               | "                   |
| "                                                        | 61mg              | 33mg                        | 15mg                | 104mg             | HERMANN (121)       |
| Leber, Maus                                              | 20mg              | 7mg                         | -                   | 12mg              | BARTHOLOMEW<br>(18) |
| "                                                        | 30%               | 11%                         | -                   | 37%               | "                   |
| Leber, Huhn                                              | 83mg              | 11mg                        | 15mg                | 60mg              | NAGATA (206)        |
| Brustmuskel, Taube                                       | -                 | 5mg                         | -                   | -                 | ERNSTER (76)        |
| "                                                        | -                 | 30-42mg                     | -                   | -                 | CHAPPELL (54)       |
| "                                                        | -                 | 4,2-5,4mg                   | -                   | -                 | AZZONE (12)         |
| Skelettmusk., Ratte                                      | -                 | -                           | -                   | -                 | -                   |
| Zuckermedium                                             | -                 | 0,9-1,6mg                   | -                   | -                 | HEDMAN (119)        |
| KCl-Medium                                               | -                 | 1,1-2,5mg                   | -                   | -                 | "                   |
| Musk., Ratte u. Maus                                     | -                 | 2-3mg                       | -                   | -                 | ERNSTER (76)        |
| Musk., Kaninchen                                         | -                 | -                           | -                   | -                 | -                   |
| KCl-Medium (0,1M)                                        | 129mg             | 10,6mg                      | -                   | 95mg              | PERRY (223)         |
| "                                                        | 55%               | 5%                          | -                   | 40%               | "                   |
| Zuckermed. (0,25M)                                       | 149mg             | 8,1mg                       | -                   | 69mg              | "                   |
| "                                                        | 66%               | 4%                          | -                   | 30%               | "                   |
| Musk., Kaninchen                                         | -                 | 6-8mg                       | -                   | -                 | CHAPPELL (54)       |
| Herzmuskel, Rind                                         | 175mg             | 1,2mg                       | 0,3mg               | 22mg              | WESTER (332)        |
| "                                                        | 88%               | 0,4%                        | 0,19%               | 10,9%             | "                   |
| Allgemein                                                | -                 | -                           | 20-25%              | -                 | DEROBERTIS 249      |
| Leber, Ratte                                             | -                 | 35%                         | -                   | -                 | ELBERS (73)         |
| nichtwässrig.M.                                          | -                 | -                           | -                   | -                 | -                   |
| <u>TROCKENSUBSTANZ: mg bzw. % der Zell-TS aus 1 g O.</u> |                   |                             |                     |                   |                     |
| Leber, Ratte                                             | -                 | -                           | 20-25%              | -                 | BIELKA (28)         |
| <u>ASCHE: mg bzw % der Zellasche aus 1 g Organ</u>       |                   |                             |                     |                   |                     |
| Leber, Ratte                                             | 4,8mg             | 0,0006mg                    | 0,0008mg            | 5,7mg             | THIERS (293)        |
| "                                                        | 37%               | 5%                          | 7%                  | 48%               | "                   |
| <u>LIPIDE: mg bze. % der Lipide aus 1 g Organ</u>        |                   |                             |                     |                   |                     |
| Leber, Ratte                                             | -                 | -                           | 50%                 | -                 | BIELKA (28)         |
| <u>PHOSPHOR: mg bzw. % des Zell-P aus 1 g Organ</u>      |                   |                             |                     |                   |                     |
| Muskel, Kaninchen                                        | -                 | -                           | -                   | -                 | -                   |
| Zuckermed. (0,25M)                                       | 74%               | 12%                         | -                   | 14%               | PERRY (223)         |
| KCl-Medium (0,1M)                                        | 68%               | 18%                         | -                   | 14%               | "                   |
| <u>RNA-PHOSPHOR: mg bzw. % aus 1 g Organ</u>             |                   |                             |                     |                   |                     |
| Zuckermed. (0,25M)                                       | 58-65mg           | 4,2-6,1mg                   | -                   | -                 | "                   |
| KCl-Medium (0,1M)                                        | 49-55mg           | 4,9mg                       | -                   | 14mg              | "                   |

Fortsetzung Tabelle 35

| Probe                                            | Kern-Fr.  | Mitochondr. | Mikros.    | Lösl.Fr. | Autor        |
|--------------------------------------------------|-----------|-------------|------------|----------|--------------|
| <u>RNA: mg bzw. % der Zell-RNA aus 1 g Organ</u> |           |             |            |          |              |
| Weser, Ratte                                     | -         | -           | 60%        | -        | BIELKA (28)  |
| "                                                | 10%       | 4%          | 60-80%     | -        | "            |
|                                                  | RNA/DNA=  | (Lysosomen  | 5mg        | 20%      | MAHLER (176) |
|                                                  | 0,15-0,22 | 2%)         | RNA/Prot.= |          |              |
|                                                  |           |             | 0,2        |          |              |
| Weser, Ratte                                     | RNA/DNA=  |             |            |          | WESER (329)  |
|                                                  | 0,25      |             |            |          |              |
| <u>DNA: mg bzw. % der Zell-DNA aus 1 g Organ</u> |           |             |            |          |              |
| Weser, Ratte                                     | 60-65%    | -           | -          | -        | MAHLER (176) |
|                                                  | Prot/DNA= |             |            |          |              |
|                                                  | 5         |             |            |          |              |
| <u>ADENINNUKLEOTIDE: mg bzw. %</u>               |           |             |            |          |              |
| Weser, Ratte                                     | -         | 25%         | -          | -        | ELBERS (73)  |
| nichtwässriges                                   |           |             |            |          |              |
| Medium                                           |           |             |            |          |              |

## 7. Verteilung chemischer Zellsubstanzen

Um eine Relation schaffen zu können, ist von Interesse, wieviel Protein oder Asche in den einzelnen Stufen der Zellfraktionation gewonnen werden. Für die Abschätzung der Organellenmenge einer Zelle können diese Angaben allerdings nicht mehr als Anhaltspunkte sein. Die biochemische Bedeutung dieses Vorgehens bleibt fraglich; es sollte zwischen Proteinen und metallbindenden Gruppen differenziert werden. Die Tabelle 35 (Seite 83) und die folgende Abbildung 22 zeigen die Verteilung der Zellproteine und verschiedener anderer Substanzen bei der Vier-Stufen-Fraktionierung.

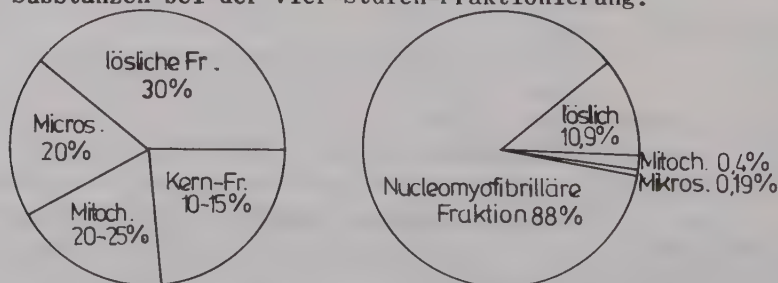


Abbildung 22: Prozentuale Verteilung des Zellproteins in den Fraktionen, links von Rattenleber (176), rechts von Rinderherz (332); (Gesamtzellprotein = 100 %)

## 8. Aufteilung des Zellvolumens

Im Zellvolumen einer Idealzelle von  $5000 \mu^3$  nehmen der Zellkern einen Raum von  $16 \mu^3$  und die Mitochondrien von  $0,8 \mu^3$  ein. (176). Bei Tumorzellen können die Zellkerne 16,7 % des Zellvolumens ausmachen (131). Die räumliche Aufteilung der Muskelfaser geht aus der folgenden Abb. 23, der morphologische und chemische Aufbau aus Abb. 24 (Seite 86) hervor.

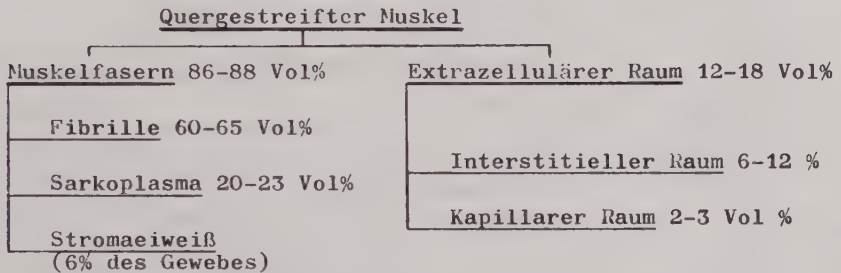


Abbildung 23: Muskelfaser, Aufteilung des Zellvolumens (106, 111, 172)

Die Vorstellung von der Zelle als "Sack voller Organellen" (128) ist Anfang des vorigen Jahrhunderts entstanden. Sie wurde zwischenzeitlich von einem Modell der Zellkompartimente abgelöst. Nicht mehr die Organellen, sondern Membranen stellen die kleinste morphologische Einheit dar. Eine Vorstellung davon vermittelt Abb. 25.

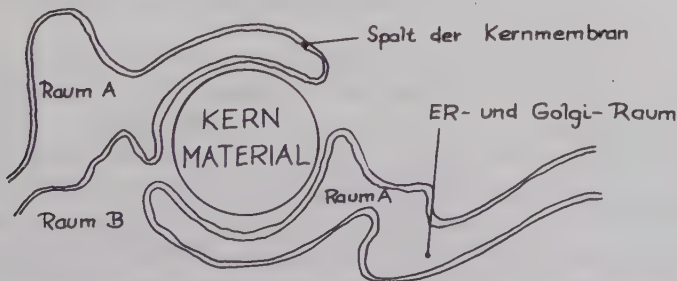


Abbildung 25: Topologie der Zelle und der Zellmembranen (128)

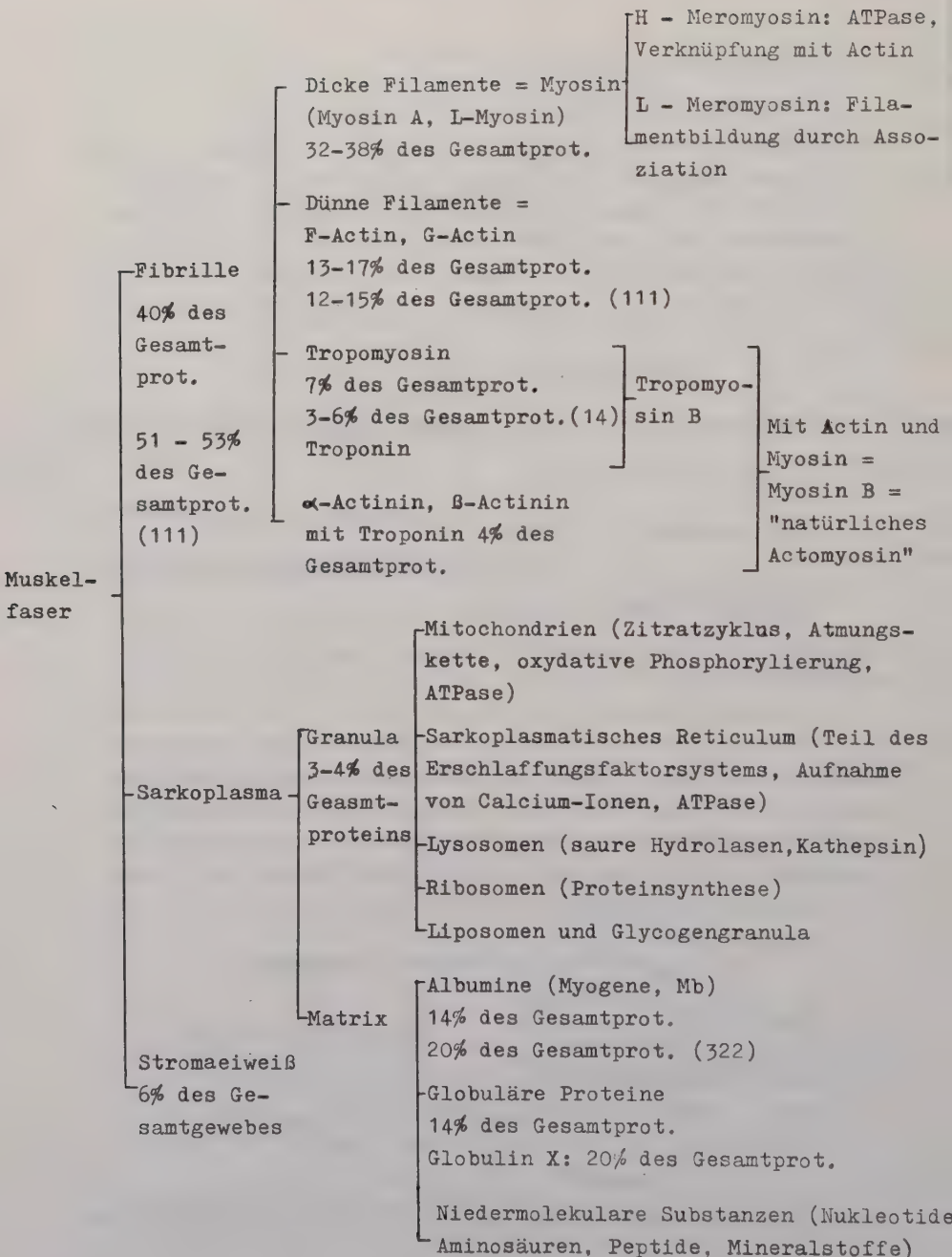


Abbildung 24: Morphologischer und chemischer Aufbau der Muskelfaser  
(21, 106, 269, 289)

Die biochemischen Reaktionen der Zelle laufen in getrennten Stoffwechselräumen ab. Kompartimente sind z.B. die von einer Membran umgebenen Organellen und das System des ER. Abbildung 26 zeigt einen Versuch der Kompartimentierung einer Zelle.

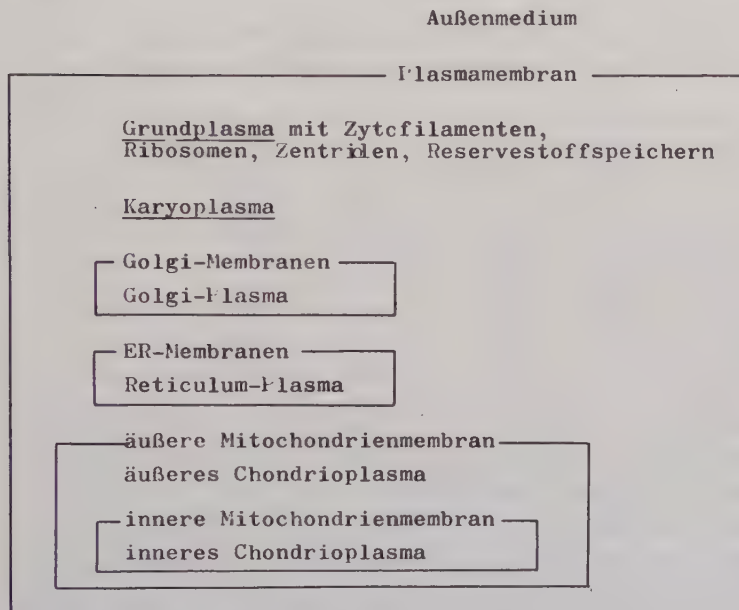


Abbildung 26: Schema der Kompartimentierung einer Zelle (191)

## 8. Konzentration des Zinks in Zellfraktionen

THIERS und VALLEE (293) untersuchten die Verteilung des Zinks in Zellfraktionen der Rattenleber. Die relative spezifische Aktivität war am größten in der löslichen Fraktion (1,6) und am kleinsten in der Mitochondrienfraktion (0,31). Die Molarität des Zinks in den Mitochondrien, berechnet aus dem Volumen des Mitochondrienrückstandes, beträgt 0,1mMol. Über die Verteilung des Zinks in der Rattenleber unterrichtet Tabelle 36 (Seite 88). Nach UNDERWOOD (304) verteilen sich die bekannten Zinkenzyme intrazellulär etwa wie das Zn.

Tabelle 36: Zink in den Fraktionen der Rattenleber (295)

|                           | Ratten-<br>leber | Kern-<br>frakt. | Mitoch.-<br>frakt. | Mikros.-<br>frakt. | Lösl.<br>Frakt. |
|---------------------------|------------------|-----------------|--------------------|--------------------|-----------------|
| mg Zn/g N                 | 0,78             | 1,1             | 0,35               | 1,4                | 1,7             |
| Prozentuale<br>Verteilung | 100              | 37,2            | 4,6                | 12,9               | 43,2            |

WESTER (332) untersuchte die subzelluläre Verteilung des Zn in Rinderherzmuskel. Über die Ergebnisse unterrichtet Tab. 37.

Tabelle 37: Zink in den Fraktionen des Rinderherzmuskels (332)

|                           | Herz-<br>muskel | Nucleo-<br>myofibr. | Mitoch.-<br>frakt. | Mikros.-<br>frakt. | Lösl.<br>Fraktion |
|---------------------------|-----------------|---------------------|--------------------|--------------------|-------------------|
| µg/g NaBgew.              | 12,8            | 10,2                | 27,2               | 15,3               | 1,2               |
|                           | -17,2           | -13,4               | -35,7              | -23,0              | -2,0              |
| µg/gProtein               | 53,5            | 48,5                | 76,4               | 26,3               | 107,0             |
|                           | -72,6           | -64,4               | -104,0             | -39,1              | -157,0            |
| Prozentuale<br>Verteilung | 100             | 72                  | 0,6                | 0,07               | 17                |
|                           |                 | -80                 | -1,2               | -0,09              | -21               |

Zink zeigt, im Gegensatz zu Eisen und Kupfer, eine relativ uniforme Verteilung. Bei Bezug auf Protein enthält die lösliche Fraktion die größten Zinkkonzentrationen. Aber auch in den Mitochondrien liegen sie noch höher als in der Gesamtzelle. Die Zinkenzyme ADH und CA finden sich in der löslichen, und GDH in der Mitochondrien-Fraktion (332). Nach HARRISON (109) beträgt der Zinkgehalt einer diploiden Rattenleberzelle  $0,8 - 1,1 \times 10^{-7}$  µg. Hunger verändert den Wert nicht signifikant. BARTHOLOMEW et al. (17, 18) untersuchten die intrazelluläre Zinkverteilung bei der Maus nach intraperitonäaler Verabreichung von  $^{65}\text{Zn}$ . In Leberzellen fand sich  $^{65}\text{Zn}$  am ersten und dritten Tag post appl. vermehrt in der löslichen und mikrosomalen Fraktion. Mitochondrien und Kerne steigerten ihren  $^{65}\text{Zn}$ -Gehalt im Verlaufe dieser drei Tage ebenfalls.  $^{65}\text{Zn}$  wird von Mammatumorzellen schneller aufgenommen als von Leberzellen. Tumorzellen zeigen eine gleichmäßige  $^{65}\text{Zn}$ -Verteilung, während in Leberzellen das meiste  $^{65}\text{Zn}$  in die lösliche und mikrosomale Fraktion wandert. Aus Dialyserversuchen ergab sich, daß Zink bei pH 6,4 und höher am stärksten gebunden ist (pk der Imidazolgruppe = 6,3). Die Verteilung des  $^{65}\text{Zn}$  in Leber-

$\frac{\text{Zn-65 der Fraktion}}{\text{Zn-65 des Homog.}} / \text{mg N}$

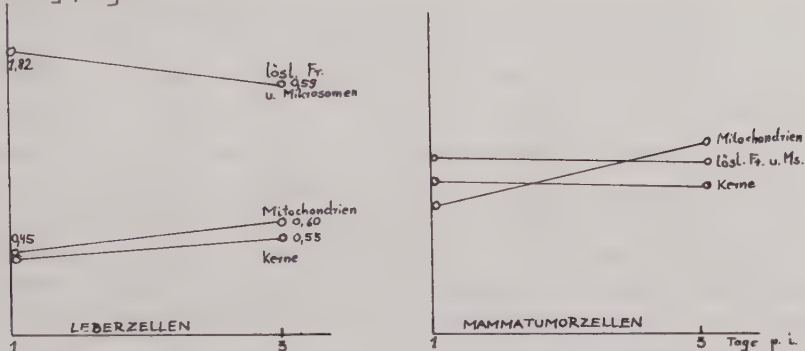


Abbildung 27:  $^{65}\text{Zn}$ -Verteilung in Leber- und Mammatumorzellen der Maus am 1. und 3. Tag p.appl. intraperitoneal (18)

zellen und Mammatumorzellen veranschaulicht Abbildung 27. Zink-65 wird nach WESER et al. (30, 331) von Zellkernen der Rattenleber bei  $37^{\circ}\text{C}$  optimal aufgenommen. Phosphationen und Nukleotidmonophosphat wirken beschleunigend. Die höchste spezifische  $^{65}\text{Zn}$ -Aufnahme erfolgt im Kern von Rattenleberzellen 5 Std. post appl. Im Homogenat ist das Maximum der  $^{65}\text{Zn}$ -Konzentration bereits nach 30 Min. überschritten. Biogene Komplexbildner beeinflussen die Aufnahme.

Nach FUHRMANN und ROTHSTEIN (82) wird Zink an der Zelloberfläche gebunden und zudem spezifisch in einen nicht-austauschbaren intrazellulären Pool transportiert.

MILLS et al. (201) warnen vor Fehlern bei Zinkverteilungsstudien wegen der unterschiedlichen Nahrungsaufnahme vor Versuchsbeginn: Offenbar besteht ein Zusammenhang der Zinkversorgung mit dem Appetit. POTTER et al. (237) beschreiben bei Verteilungsstudien in gleicher Umwelt Fehler wegen metabolischer Oszillationen.

## 9. Subzelluläre Verteilung anderer Minerale

HERMAN und KUN (121) untersuchten die intrazelluläre Kupferverteilung in Abhängigkeit von Hypophysektomie und Wachstumshormon. Die Konzentration  $\mu\text{Mol Cu/g N}$  ist am größten in den

Mitochondrien und am kleinsten in den Mikrosomen. Das Mitochondrienkupfer ist abhängig vom STH, dem Cu-Angebot und von der Rasse der Tiere. Der größte Teil des Cu läßt sich durch Dialyse nicht entfernen.

Nach MAHLER und CORDES (176) enthält das Herzmuskel-Mitochondrion pro Gramm Protein 1,46  $\mu$ -Atom non-häm-Cu, 3,3 - 6,4  $\mu$ -Atom non-häm-Fe und 2,5  $\mu$ -Atom häm-Fe. Von THIERS und VALLEE (293) liegen auch umfangreiche Mineralverteilungsstudien vor. Die Molarität der Metalle in den Mitochondrien - durch Bestimmung der Volumina der Mitochondriensedimente - geben sie wie folgt an:

|  | K | Na  | Mg | Ca  | Fe  | Mn   | Zn  | Cu   |
|--|---|-----|----|-----|-----|------|-----|------|
|  | 4 | 0,9 | 3  | 0,8 | 0,4 | 0,03 | 0,1 | 0,05 |

Die Zellkernfraktion, verhältnismäßig groß, weil mit vielen Mitochondrien vermischt, enthält den Großteil von Mn, Ca und Mg. Mitochondrien erweisen sich als reich an Mg, Mn und Cu. Die Metallverteilung der löslichen Fraktion stellt das Spiegelbild der Verhältnisse in den Mitochondrien dar. In jeder Fraktion ist jedoch Kalium das vorherrschende Mineral. Die lösliche Fraktion enthält beispielsweise zehnmal soviel K als Na, die Partikelfractionen dreimal soviel K als Mg. Die folgende Tab. 38 gibt Auskunft über die relative spezifische Aktivität (%uale Verteilung des Metalles/%uale Verteilung von N) von Metallen in Fraktionen der Rattenleber.

Tabelle 38: Relative spez. Aktivität in Zellfraktionen (293)

| Element | Maximum in                         | Minimum in               |
|---------|------------------------------------|--------------------------|
| Mn      | Kerne (1,6)<br>Mitochondrien (1,3) | Lösliche Fraktion        |
| Fe      | Lösliche Fraktion                  | Kerne                    |
| Ca      | Mitochondrien (2,2)                | Lösliche Fraktion (0,38) |
| Mg      | Mitochondrien                      | -                        |
| Na,K,Cu | Lösliche Fraktion                  | Partikel-Fractionen      |
| Zn      | Lösliche Fraktion (1,6)            | Mitochondrien-Fr. (0,31) |

WESTER (332) beschreibt Mineralverteilungen in Fraktionen des Rinderherzens. Über seine Ergebnisse informiert Tabelle 39 (S. 91). Mitochondrien lagern Ca-Ionen an. F verteilt sich in anderer Weise und fungiert nicht als Begleiter des Ca. Der Cu-Gehalt der Mitochondrien läßt auf die Anwesenheit der Cytochromoxydase schließen. Das Fe in den Mikrosomen ist möglicherweise

Tabelle 39: Verteilung von Elementen in Rinderherzmuskel in  $\mu\text{g/g}$  Protein; Werte gerundet (332)

| Element | Herz-muskel | Kern-Frakt. | Mitoch.-Frakt. | Mikros.-Frakt. | Lösl. Fraktion |
|---------|-------------|-------------|----------------|----------------|----------------|
| Ca      | 140         | 100         | 700            | 110            | 160            |
| Fe      | 150         | 80          | 210            | 1900           | 600            |
| Cu      | 18          | 17          | 230            | 30             | 20             |
| P       | 8000        | 6000        | 7000           | 4000           | 20000          |
| Zn      | 60          | 56          | 90             | 32             | 130            |

an Ferritin enthaltende Partikel fixiert. Das Molybdänenzym Xanthinoxidase befindet sich in der löslichen Fraktion.

Unter pathologischen Bedingungen können nach LINDNER (171) in Mitochondrien Fe, Hg und andere Schwermetalle enthalten sein (elektronenoptischer Nachweis). Nach PORTER (236) enthält das Mitochondriocuprein der Leber des Neugeborenen an der Mitochondrieninnenmembran 4 % Cu. Es fungiert eventuell als Speicher für die Cytochromoxydase. Über die intrazelluläre Verteilung der Metalle Na, K, Ca und Mg berichtet SCHÜTTE (266). Die Ergebnisse sind in Tabelle 40 dargestellt.

Tabelle 40: Verteilung von 4 Metallen in der Zelle (266)

| Metall                | Kern-Frakt. | Mitoch.-Frakt. | Mikros.-Frakt. | Lösl. Fraktion |
|-----------------------|-------------|----------------|----------------|----------------|
| K, % im Frischgew.der | 13,6        | 18,4           | 11,9           | 52,7           |
| Na, " " "             | 12,5        | 6,8            | 14,4           | 65,6           |
| Ca, " " "             | 15,5        | 47,7           | 23,7           | 26,6           |
| Mg, " " "             | 13,4        | 21,8           | 48,0           | 12,8           |

#### 10. Weitere Methoden zur Untersuchung intrazellulärer Mineralverteilungen

SCOTT (269) und DRAPER u. HODGE (63) untersuchten die Ascheverteilung in den Myofibrillen mit Hilfe der Spodographie. Es handelt sich dabei um eine Mikroverbrennung im Elektronenstrahl. Z- und M-Linie verschwinden. Die A-Bande zeigt eine größere Aschedichte als die I-Bande. Vorhanden sind nur noch Fe, Ca, Mg und P. TIMM (294) gelang bei dieser Mikro-Incineration im Spodogramm mit Hilfe von  $\text{H}_2\text{S}$  oder Dithizon der Zink-

nachweis.

MILLAR et al. (192) setzten zur Feststellung der intrazellulären Mineralverteilung an Testes, Ileum und Frostata die Mikroautoradiographie ein. Nach LEIBETSEDER (169) kann mit dieser Methode der Verlauf einer intrazellulären Zink-65-Verteilung verfolgt werden.

In der Elektronenmikroskopie geben P, Mg, Fe, Cu und Zn einen Bildkontrast (171). Eine Studie über die Fe-Verteilung in den Mitochondrien liegt von LINDNER (171) vor. Auch ein Nachweis von Metallen mit Methoden der Zytochemie scheint möglich. Zink wurde mit Dithizon und  $H_2S$  ermittelt (67, 113, 317). Nach RASKOVIC (145) ergibt Zincon mit Zn, Cu, Co und Ni farbige Komplexe. Mit Hilfe dieser Methode wurde die Lokalisation des Zn in den eosinophilen Granulozyten des Menschen nachgewiesen.

FRANK (80) lokalisierte Mineralien in menschlichem Zahngewebe mit Hilfe der Gammastrahlbeugung. Die Gammastrahlfluoreszenz zum Nachweis von Metallen wurde von HALL (94) versucht.

## C. Eigene Versuche

Die Untersuchungen dienten der Feststellung von Zinkkonzentrationen in Geweben und deren Zellfraktionen, die nach der Sedimentationsgeschwindigkeit von Organellen oder nach der Extrahierbarkeit von Proteinen gewonnen worden waren. Zu Beginn wird die Methode der Zinkbestimmung beschrieben und kritisch beurteilt.

### I. Beschreibung und Beurteilung der Zink-, Trockensubstanz-, Asche- und Proteinbestimmung

#### 1. Problemstellung und Prinzip

Die Bestimmung von TS, Asche, Protein und Zink in biologischem Material bei Probemengen von entsprechend 5 mg - 1000 mg Protein und 1 µg bis 250 µg Zink ist im Prinzip des Analysenganges der folgenden Abbildung 28 zu entnehmen.

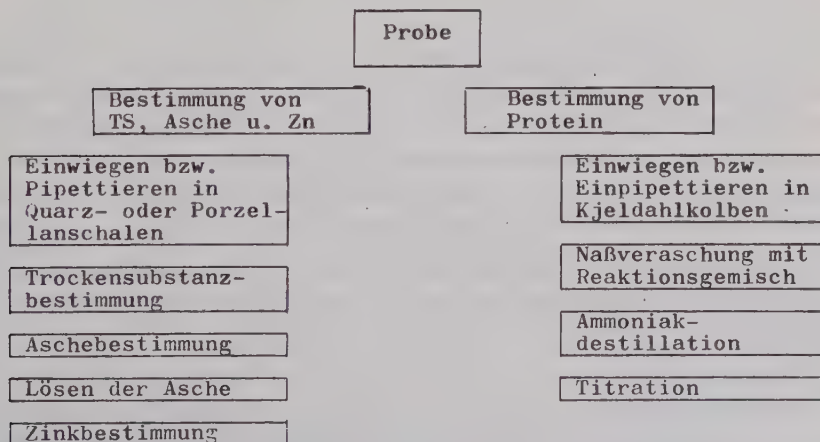


Abbildung 28: Analysengang bei der TS-, Asche-, Zink- und Proteinbestimmung

## 2. Trockensubstanz- und Aschebestimmung

Die Bestimmung der Trockensubstanz erfolgte allgemein durch Trocknung des Untersuchungsmaterials bei  $110^{\circ}\text{C}$ . Als Gefäße wurden Porzellan- und Quarzschalen verwendet. Grundsätzlich kann die Mineralisation trocken oder naß erfolgen. Für Zinkbestimmungen erhält jedoch die Trockenveraschung den Vorzug. Die Flüchtigkeit des Zinks bei höheren Temperaturen - Siedepunkt des Zn:  $908,5^{\circ}\text{C}$ , des  $\text{ZnCl}_2$ :  $730^{\circ}\text{C}$  (126) - zwingt jedoch zur Veraschung bei relativ niedrigen Temperaturen. Angegeben werden von PALLAUF und KIRCHGESSNER (219)  $450^{\circ}\text{C}$ , von STREHLOW und KNEIP (282)  $500 - 600^{\circ}\text{C}$  und von den meisten Autoren (53, 135, 155, 225) beliebige Temperaturen zwischen  $450$  und  $600^{\circ}\text{C}$ . Bei höheren Temperaturen muß mit Zinkverlusten gerechnet werden. Vorteile der Trockenveraschung sind neben dem geringen Arbeits- und Materialaufwand die direkte Aschegewichtsbestimmung. Außerdem besteht nicht wie bei der nassen Mineralisation die Möglichkeit der Einschleppung von Verunreinigungen mit den Aufschlußreagenzien. Dieser Gesichtspunkt erhält bei der Bestimmung von Elementspuren besondere Bedeutung.

Als nachteilig werden bei der Trockenveraschung der relativ hohe Zeitaufwand und die Geruchsbelästigung empfunden. Fehlermöglichkeiten wie Reaktionen der Aschebestandteile mit dem Gefäßmaterial, Einbrennen, Entstehen unlöslicher Verbindungen, mechanisches Verspritzen während der Veraschung können durch die Wahl geeigneter Veraschungsgefäße (Quarz- oder Porzellan-schalen, Platintiegel), sowie vorsichtiges Manipulieren während des Veraschens weitgehend vermieden werden.

Trockensubstanz- und Aschegewichte weisen einen systematischen Fehler auf, wenn Proben mit Zucker- oder Salzmedien verdünnt werden.

## 3. Zinkbestimmung

Zur Zinkbestimmung wird gegenwärtig häufig die Atomabsorptionsspektrometrie in der Flamme verwendet. Mit dem Luft/ $\text{C}_2\text{H}_2$ -Brenner arbeitet die Methode im optimalen Arbeitsbereich  $0,2 - 3,0$   $\mu\text{g Zn/ml}$  wässrige Lösung weitgehend störungsfrei (3).

Colorimetrische Bestimmungen erfordern demgegenüber eine aufwendige Labortechnik, bei der Emissionsspektrometrie besteht die Gefahr von Interferenzen durch andere in der Matrix befindliche Substanzen.

Die Absorptionsspektrometrie wird neben der Emissionsspektrometrie seit dem Jahre 1955 für die Analytik herangezogen (85). Das Prinzip ist seit Kirchhoff bekannt, der die Frauenhofer'schen Linien als Absorptionslinien des kontinuierlichen Spektrums des Sonneninneren durch die kühlere Atmosphäre deutete. Es handelt sich um eine Wechselwirkung elektromagnetischer Strahlen mit der Atomhülle.

Bei der Flammenatomabsorption wird die Probelösung über einen Plastikschauch angesaugt und in die Flamme eines mit Acetylen und Luft arbeitenden Laminar- oder Turbulenzbrenners gesprüht. Die Flammenenergie atomisiert in der Lösung befindliche Moleküle. Ein starker Lichtstrahl - seine Wellenlänge ist charakteristisch für das gesuchte Element - wird durch die Flamme hindurch zu einem Monochromator geschickt. Licht typischer Bandbreite ist notwendig wegen der geringen Energieabgabe durch Atomabsorption. Der entstehende monochromatische Strahl fällt auf einen Photomultiplier-Detektor. Die Menge der Energie einer bestimmten Wellenlänge, die in der Flamme absorbiert wird, ist eine Funktion der Konzentration des gesuchten Elementes in der Probe. Die folgende Abbildung 29 veranschaulicht das Prinzip der Atomabsorption.

|                                           |                                       |                          |                                                                  |              |
|-------------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------|------------------------------------------------------------------|--------------|
| Licht-<br>quelle<br>bekannter<br>Emission | Atom-<br>isierung<br>in der<br>Flamme | Prisma<br>und<br>Schlitz | Photographische<br>Emulsion oder<br>Photoröhre mit<br>Verstärker | Schreiber    |
| Quelle                                    | Probe                                 | Mono-<br>chromator       | Detektor                                                         | Aufzeichnung |

Abbildung 29: Schematische Darstellung der Atomabsorptionsspektrometrie in der Flamme

#### 4. Beurteilung der Methode

1. Die praktische Durchführbarkeit der Methode gestattet Reihenuntersuchungen. Material- und Zeitaufwand sind im Vergleich zu anderen Methoden nur gering.

2. Spezifität: Für Zink ist die Absorptionslinie von 213,9 nm spezifisch (3). Zinkdampf ist einatomig (126). Störende Begleitstoffe können gleich Null gesetzt werden (85). Physikalische (atomare) Interferenzen entstehen durch Anionen (Phosphat, Sulfat, Aluminat), die mit Erdalkalien stabile Komplexe bilden und damit die Atomisation herabsetzen. Abhilfe bringt nach COOKE und WONDZINSKI (58) ein Zusatz von Metallsalzen (Lanthanchlorid), die Verbindungen mit dem störenden Anion bilden. Nach SCHMIDT (263) stören größere Alkalimengen die Zinkmessung durch Erniedrigen der Flammentemperatur. Lanthanoxid verhindert auch die bei niedriger Temperatur auftretende Bildung von Zinkoxid. Zur Prüfung der Effizienz des Lanthanoxidzusatzes bei der Zinkmessung wurde den in 0,1N HCl gelösten Aschen von fünf Organproben 2 ml Lanthanoxidlösung (5%) zugesetzt. Zur Messung wurde mit 0,1N HCl ad 20,0 aufgefüllt. Über die erhaltenen Resultate informiert Tabelle 41.

Tabelle 41: Prüfung des Zusatzes von Lanthanoxid bei der Zinkbestimmung in der Flamme

| Nr.      | Mit $\text{La}_2\text{O}_3$<br>ug Zn/g Probe | Ohne $\text{La}_2\text{O}_3$<br>ug Zn/g Probe | Differenz pro<br>Gramm Probe |
|----------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------------|
| 1        | 40,3                                         | 41,1                                          | +0,8                         |
| 2        | 32,5                                         | 32,6                                          | +0,1                         |
| 3        | 60,8                                         | 60,1                                          | -0,7                         |
| 4        | 50,1                                         | 49,0                                          | -1,1                         |
| 5        | 50,9                                         | 48,8                                          | -2,1                         |
| $\Sigma$ |                                              |                                               | -3,0                         |

Ihr kann entnommen werden, daß der Zusatz von Lanthanoxid keine Verbesserung der Zinkbestimmungen ergibt.

Hintergrund- oder Matrixinterferenzen durch einen Überschuß von Metallen oder durch Rauchbildung in der Flamme treten bei gut veraschtem biologischem Material nicht auf. Eine Angleichung der Eichlösungen an den Salzgehalt der Proben bringt keine Veränderung der Absorption. Die Rauchbildung, gemessen bei

219 nm, d.h. nahe der Zinklinie, ist vernachlässigbar klein.

### 3. Empfindlichkeit:

Die Luft/ Acetylen-Flamme ergibt eine für die Zinkbestimmung genügend heiße und leicht zu kontrollierende Flamme (58). Veränderungen des Strahlenganges (double beam, triple pass, background correction durch zweite Lichtquelle) bringen nach FUWA (85) keine methodische Verbesserung. COOKE und WONDZINSKI (58) geben die Empfindlichkeit der Methode für Zink mit 0,02 ppm an, was 1 % des maximalen Absorptionssignales entspricht. FUWA (85) gibt sie mit 0,0002 ppm an; In eigenen Versuchen betrug sie bei Verwendung einer 0,1N salzsauren Zinkchloridlösung 0,025 ppm bzw. 0,05 ug Zn in 2 ml Lösung.

COOKE und WONDZINSKI (58) ermittelten als Nachweisgrenze für Zn 0,001ppm (Konzentration des Elementes mit dem Signal, das der zweifachen Standardabweichung des Untergrundsignales entspricht =  $2 \times \sigma_B$ ), KOCH (155) 0,003 ppm (kleinste nachweisbare qualitative Menge =  $L_D = 3,29 \times \sigma_B$  bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha$  von 5 %), MARSHALL und SMITH (177) bei gleicher Irrtumswahrscheinlichkeit 0,002 ppm. In eigenen Versuchen lag die Nachweisgrenze ( $L_D = 3,29 \times \sigma_B$  bei  $\alpha = 5 \%$ ) bei 0,069 ppm oder 0,138 ug Zn in 2 ml Lösung. Als Bestimmungsgrenze gibt KOCH (155) (kleinste nachweisbare quantitative Menge =  $L_Q = 10 \times \sigma_B$  bei  $\alpha = 5 \%$ ) 0,01 ppm an. Eigene Versuche ergaben 0,21 ppm.

### 4. Richtigkeit:

Sie wird als Kriterium am meisten ausgewertet, denn die Gefahr einer Einschleppung oder eines Verlustes ist bei Zn besonders groß, wobei als empfindlichster Schritt die Veraschung gilt. Außerdem können Begleitstoffe in den untersuchten Proben die Absorption unspezifisch verändern.

Zur Ermittlung der geeigneten Veraschungsmethode wurden mehrere Verfahren auf ihre Eignung geprüft. Über die Ergebnisse gibt die Tabelle 42 Aufschluß. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha = 5 \%$  besteht in der Effizienz der verglichenen Veraschungsmethoden kein signifikanter Unterschied.

Tabelle 42: Vergleich der Veraschungsmethoden: Aus einem Gewebehomogenat wurden 25 Proben à 2,0 g bei verschiedenen Veraschungsmethoden auf den Zinkgehalt untersucht.

- 1) Trockenveraschung bei 400°C, 2) bei 500°C, 3) bei 600°C,
- 4) Naßveraschung, Makromethode, in einem Gemisch von 17 ml konz. HNO<sub>3</sub> und 3 ml konz. HClO<sub>4</sub>,
- 5) Naßveraschung, Mikromethode, im Teflonführchen unter Druck mit 1 ml konz. HNO<sub>3</sub>

| Nr. | Ver-<br>aschung | ug Zn/g<br>Probe | $\bar{x}$ | s    | V(%) | Test                                                                                                                       |
|-----|-----------------|------------------|-----------|------|------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1   | 1               | 35,2             |           |      |      | Einfache<br>Varianzanalyse<br>mit gleicher<br>Besetzung:<br>kein signifi-<br>kanter Unter-<br>schied bei<br>$\alpha = 5\%$ |
| 2   | 1               | 32,1             |           |      |      |                                                                                                                            |
| 3   | 1               | 36,1             |           |      |      |                                                                                                                            |
| 4   | 1               | 35,1             |           |      |      |                                                                                                                            |
| 5   | 1               | 35,7             | 34,80     | 1,58 | 4,0  |                                                                                                                            |
| 6   | 2               | 35,3             |           |      |      |                                                                                                                            |
| 7   | 2               | 36,0             |           |      |      |                                                                                                                            |
| 8   | 2               | 35,3             |           |      |      |                                                                                                                            |
| 9   | 2               | 34,9             |           |      |      |                                                                                                                            |
| 10  | 2               | 34,8             | 35,26     | 0,47 | 1,3  |                                                                                                                            |
| 11  | 3               | 33,2             |           |      |      |                                                                                                                            |
| 12  | 3               | 28,0             |           |      |      |                                                                                                                            |
| 13  | 3               | 30,1             |           |      |      |                                                                                                                            |
| 14  | 3               | 35,2             |           |      |      |                                                                                                                            |
| 15  | 3               | 34,9             | 32,28     | 3,13 | 9,0  |                                                                                                                            |
| 16  | 4               | 35,7             |           |      |      |                                                                                                                            |
| 17  | 4               | 36,7             |           |      |      |                                                                                                                            |
| 18  | 4               | 35,1             |           |      |      |                                                                                                                            |
| 19  | 4               | 38,0             |           |      |      |                                                                                                                            |
| 20  | 4               | 32,6             | 33,62     | 4,31 | 12,8 |                                                                                                                            |
| 21  | 5               | 36,1             |           |      |      |                                                                                                                            |
| 22  | 5               | 35,1             |           |      |      |                                                                                                                            |
| 23  | 5               | 35,2             |           |      |      |                                                                                                                            |
| 24  | 5               | 35,4             |           |      |      |                                                                                                                            |
| 25  | 5               | 35,6             | 35,48     | 0,38 | 1,1  |                                                                                                                            |

Als Maß der Richtigkeit von Untersuchungsergebnissen wird die Wiederauffindungsrate angegeben. Sie betrug in eigenen Versuchen, bei Zugaben von 25 - 50 ug Zink zu Proben von Muskel und Leber, 93,3 - 100,4 %. Die Ergebnisse dieser recovery-Versuche sind in Tabelle 43 (Seite 99) aufgeführt. In der Literatur waren folgende Wiederauffindungsraten ermittelt worden: 94 % bei Naßveraschung (23); 94 - 101 % bei Naßveraschung (155); 92 - 102 % bei Trockenveraschung (450°C) (226); 96 - 100 % bei Trockenveraschung (550°C) (155).

Tabelle 43: Wiederauffindungsraten von Zink

| Probe  | Messung<br>Nr. | Pr.<br>g | Zugabe<br>µg Zn | Zn gemessen<br>µg/g Probe | erwartet<br>µg/g Probe | recovery<br>% |
|--------|----------------|----------|-----------------|---------------------------|------------------------|---------------|
| Muskel | 1              | 1,0      | -               | 27,0                      | 26,5                   |               |
|        | 2              | 0,5      | -               | 26,0                      |                        |               |
|        | 3              | 0,5      | 25              | 74,0                      | 76,5                   | 96,7          |
|        | 4              | 0,5      | 25              | 73,1                      | 76,5                   | 95,6          |
|        | 5              | 0,5      | 50              | 118,0                     | 126,5                  | 93,3          |
|        | 6              | 0,5      | 50              | 127,0                     | 126,5                  | 100,4         |
| Leber  | 7              | 1,0      | -               | 48,0                      | 50,0                   |               |
|        | 8              | 0,5      | -               | 52,0                      |                        |               |
|        | 9              | 0,5      | 25              | 98,0                      | 100,0                  | 98,0          |
|        | 10             | 0,5      | 50              | 140,0                     | 150,0                  | 93,3          |

### 5. Genauigkeit:

Sie wird als Streuungsmaß angegeben und betrug in eigenen Versuchen 1,3 - 6,7 % (Variationskoeffizient). Die Versuchsanordnung ist der Tabelle 44 zu entnehmen.

Tabelle 44: Trockenveraschung (500°C) und Zinkbestimmung von drei Proben; 1) Fleischeinwage 1,0 g; 2) Fleischeinwage 0,4 g; 3) Lebereinwage 0,4 g

| Probe         | Messung | µg Zn/g Probe | $\bar{x}$ | s       | V(%) |
|---------------|---------|---------------|-----------|---------|------|
| 1             | 1       | 35,3          | 35,26     | 0,47    | 1,3  |
|               | 2       | 35,3          |           |         |      |
|               | 3       | 36,0          |           |         |      |
|               | 4       | 34,9          |           |         |      |
|               | 5       | 34,8          |           |         |      |
| 2             | 6       | 39,0          | 37,48     | 2,50    | 6,7  |
|               | 7       | 38,7          |           |         |      |
|               | 8       | 34,5          |           |         |      |
|               | 9       | 40,1          |           |         |      |
|               | 10      | 35,1          |           |         |      |
| 3             | 11      | 55,3          | 53,72     | 2,55    | 4,75 |
|               | 12      | 53,1          |           |         |      |
|               | 13      | 53,2          |           |         |      |
|               | 14      | 50,1          |           |         |      |
|               | 15      | 56,9          |           |         |      |
| Blind<br>wert | 16      | 0,04          | 0,021     | 0,04559 | -    |
|               | 17      | 0,10          |           |         |      |
|               | 18      | 0,00          |           |         |      |
|               | 19      | 0,00          |           |         |      |
|               | 20      | 0,08          |           |         |      |

ALLAN (4) bezeichnet einen Variationskoeffizienten von 4 % als hinreichend. KOCH (155) wertet Bestimmungen mit  $V = 5 \%$  als vorzüglich,  $V = 10 \%$  als sehr gut und  $V = 20 \%$  als zufriedenstellend. PERSIGHEL et al. (230) geben bei Serumzinkbestimmungen eine "doppelte Standardabweichung" an; sie soll bei Atomabsorptionsspektrometrie 12 % und bei Neutronenaktivierungsanalyse 8 % betragen. MARSHALL und SMITH (177) erhielten bei Atomabsorptionsspektrometrie einen Variationskoeffizienten von 1,8 % (0,05 ppm level) bzw. 4 % (0,01 ppm level). Die eigene Zinkbestimmungsmethode, inclusive Veraschung, ergibt bei Fleischproben von 0,4 g mit ca. 40 ppm Zinkgehalt einen Variationskoeffizienten von 6,7 %. Bei Vermessung von Zinklösungen in 0,1N HCl ergeben sich bei 0,3 ppm level  $V = 0,12 \%$  und bei 1 ppm level  $V = 0,08 \%$ .

## 5. Darstellung der Ergebnisse und Statistik

DAVIES et al. (61), sowie OBERLEAS und PRASAD (214) erscheinen alle bisherigen Zinkbestimmungen wegen der willkürlichen Wahl der Bezugsgrößen anfechtbar. In diesem Zusammenhange sei daran erinnert, daß sich bei Zinkmangel z.B. die Bezugsgrößen Protein und Trockensubstanz verändern. Ideal wäre die Beziehung Zink/Zelle oder Zink/DNS, weil die DNS-Menge konstant bleibt (214). Bei Kleintieren ist auch die Relation Zink/Organ denkbar. Der Bezug Zink/TS gibt ein unklares Ergebnis, weil diese Größen voneinander abhängig sind. Die geringste Streuung weist nach STEFHOW und KNEIP (282) die Aschebestimmung auf.

## 6. Arbeitsvorschrift für die Bestimmung von TS, Asche und Zink

### Geräte und Reagenzien:

Analysenwaage;

Trockenschrank;

Muffelofen;

Homogenisatoren (Starmix, Waring Blendor, Potter-Elvehjem);

Porzellan- und Quarzschalen;

Meßkölbchen 10 - 50 ml;

HCl-Lösung (1N), Fa. Merck, max. 0,1 ppm Zn in konz. HCl;

Lanthanoxidlösung (5%);

Atomabsorptionsspektrometer, Beckman 444 mit Autolam-Brenner und Converter für digitale und analoge Aufzeichnung der Extinktion; Lampenstrom 20 mA; Brenngas Acetylen; Trägergas Preßluft; Autolambrenner in Längsrichtung, Absorption im blauen

Innenkonus der Flamme; Optik: 213,9 nm, single beam, simple pass, Monochromatorschlitz Pos. 6 = 0,4 mm Schlitzbreite; Eichung mit externem Standard (Eichkurve) mehrmals in jeder Meßreihe.

#### Allgemeine Laborpraxis:

Geräte werden in 2N HCl aufbewahrt und vor Gebrauch in Aqua dest. gespült (18, 37, 286, 332). Wasser wird im Austauscher deionisiert (ein Vergleich mit Aqua tridestillata brachte keinen Unterschied).

Die Ergebnisse stellen jeweils den Mittelwert einer Doppelprobe dar. Bei Unterschieden von mehr als 20 % wird der Versuch verworfen.

#### Arbeitsvorschrift: (18, 37, 135, 225, 286, 306, 332)

|                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Einwiegen:         | in Quarzschalen, die nach Erhitzung auf 200°C und Abkühlen im Exsikkator vorgewogen sind;                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Trocknen:          | des Untersuchungsmaterials bei 110°C bis zur Gewichtskonstanz (ca. 10 Std.), TS-Bestimmung;                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Veraschen:         | bei 325°C über Nacht, anschließend Nachveraschen für ungefähr 5 Std. bei 500°C;<br>Nicht restlos veraschte Rückstände werden in einigen Tropfen konz. Salpetersäure gelöst, auf der Heizplatte erhitzt und anschließend wieder gegläht;<br>Aschegewichtsbestimmung nach Abkühlen im Exsikkator;<br>Ein Teil der Proben wird im Teflonröhrchen nach Zusatz von 1 ml konz. HNO <sub>3</sub> (suprapur) bei 150°C für 2 Std. unter Druck verascht; |
| Lösen der Asche:   | Die in 0,1N HCl gelöste Asche wird über ein Faltenfilter in ein Meßkölbchen überführt;                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Messung des Zinks: | Der Absorptionswert am Schreiber wird mit 0,1N HCl auf Null Skalenteile gebracht, und Eich- und Probelösungen vermessen.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |

#### 7. Proteinbestimmung - Arbeitsvorschrift

Die Proteinbestimmung erfolgt als N-Bestimmung nach Kjeldahl. Die zumeist angewendete Mikromethode für die Bestimmung von 2,4 bis 40 mg Protein in 1 - 4 ml Lösung gestaltet sich wie folgt (1).

Das gelöste Untersuchungsmaterial wird in ein Kölbchen pipettiert und 2 ml Veraschungsgemisch nach Campell und Hanna zugefügt (Konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und konz. H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> v/v 3:1; pro 100 ml Zusatz von 2 g Reaktionsgemisch).

Nach beendeter Mineralisation werden die Kölbchen mit H<sub>2</sub>O

auf ca. 10 ml aufgefüllt und nach Zugabe von 20 ml 5N NaOH der Wasserdampfdestillation unterworfen.

Als Vorlage gibt man ca. 20 ml einer 2%igen Borsäurelösung und einige Tropfen Tashiroindikator ( $\text{pH} < 5$  rot) in die "Falle", läßt ca. 10 ml überdestillieren und bestimmt die Menge des in der Falle aufgefangenen Ammoniaks durch Titration mit 0,01N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Daraus errechnet sich das Protein nach der Formel:  $\text{mg Protein} = \text{verbrauchte ml H}_2\text{SO}_4 \times 0,14 \times 6,25$ ;

Es werden immer Doppelbestimmungen vorgenommen. Der Variationskoeffizient - berechnet aus 20 Bestimmungen - beträgt bei Mengen bis zu 10 mg Protein 3,9 %, bei Mengen bis 40 mg Protein 2,2 %.

## II. Intrazelluläre Verteilung von Zink in Leber, sowie in Herz- und Skelettmuskel

### 1. Problemstellung

In diesen Untersuchungen war beabsichtigt, die Verteilung des Zinks in den Zellen von Muskel- und Lebergewebe zu ermitteln und Anhaltspunkte für die Art der intrazellulären Zinkbindung zu gewinnen. Um eine Vergleichbarkeit mit den Daten der Literatur zu ermöglichen, wurden folgende Variablen berücksichtigt: a) Gewebe von Skelett- und Herzmuskel, sowie von Leber, b) die Tierarten Schwein, Rind und Taube, c) die Art der Gewebekomposition.

### 2. Methodik

Die Methodik basiert auf dem klassischen Fraktionsmodell nach HOGEBOOM (125). Das Prinzip ist in Abbildung 30 schematisiert. Man erhält drei Zellfraktionen, die auf den Gehalt an TS, Asche, Protein und Zn untersucht werden.

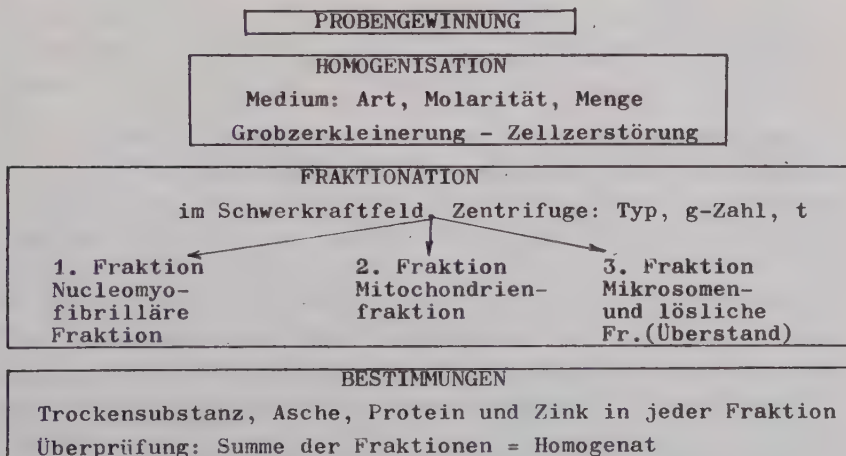


Abbildung 30: Prinzip der Methodik

An Geräten und Reagenzien stehen zur Verfügung:

- Homogenisator nach Potter-Elvehjem, Glasrohr mit Teflonstempel; ca. 200 rpm
- Waring Blender
- Zentrifuge, Christ Zeta 20 mit Kühlaggregat; Winkelkopf, Plastikzentrifugengläser, Gesamtinhalt 400 ml; Maximale Drehzahl 20.000 rpm = 25.000 g
- Atomabsorptionsspektrometer Beckman 444; Geräte und Reagenzien der Zinkbestimmung
- Mikrokjeldahl Destillationsgerät für 6 Proben
- Medium nach CHAPPELL und PERRY (54):
  - 0,12M KCl
  - 0,05M Tris-Puffer
  - 0,005M  $MgSO_4$
  - 0,001M EDTA
- Zuckermedium: 0,25M Saccharoselösung
- EDTA (0,001M)
- Trichloressigsäure (20%)

#### Probengewinnung:

Es wird aus fleischtechnologischen Erwägungen Muskulatur von Schwein und Rind, sowie aus methodischen Überlegungen Leber und Taubenbrustmuskel ausgewählt. Der M. pectoralis major der Taube eignet sich wegen seines hohen Gehaltes an Mitochondrien für derartige Untersuchungen besonders. Er wurde zweijährigen Reisetauben entnommen (ohne M. pectoralis minor) und in KCl-Lösung von 0°C gekühlt. Die Zeit bis zur Gewebehomogenisation beträgt maximal 30 Minuten. Die Proben von Leber, sowie von Skelett- und Herzmuskel stammen von frischgeschlachteten Rindern und Schweinen. Die Proben werden für den Transport in Eis gekühlt. Über die Art der Gewebeproben, sowie über die Zink-, TS-, Asche- und Proteingehalte gibt Tabelle 45 Auskunft.

#### Probenaufbereitung:

Die Aufarbeitung der Probe, die Fraktionierung und die ausgeführten Bestimmungen sind in Abbildung 31 (Seite 106) schematisch dargestellt. Im einzelnen wird wie folgt verfahren. Etwa 60 g der Gewebeprobe werden von groben Fett- und Bindegewebsanteilen befreit und im Fleischwolf zerkleinert. Anteile für die TS-, Asche-, Zink- und Proteinbestimmung werden entnommen. 50 g des Gewebes kommen mit 950 ml Medium zur Homogenisation. Bei dem Grinder nach Potter und Elvehjem erweist es sich als günstig, zur Vermeidung von Klumpenbildung anfangs mit lose, später mit eng sitzendem Stempel zu arbeiten. Restliche Gewebedebris können durch Filtern mit Gaze

Tabelle 45: Die Gewebeproben bei der Zellfraktionierung mit den Angaben der TS-, Asche-, Zink- und Proteingehalte

| Nr.     | Gewebe, Tierart           | TS<br>% | Asche<br>% | Prot.<br>% | Zink<br>ppm |
|---------|---------------------------|---------|------------|------------|-------------|
| 1;2     | M.pectoralis major, Taube | 29,6    | 1,6        | 24,1       | 12,0        |
| 3;4     | "                         | 32,0    | 1,3        | 24,7       | 17,0        |
| 5;6     | "                         | 35,6    | 1,9        | 23,1       | 19,8        |
| 7;8     | "                         | 28,1    | 1,8        | 23,9       | 12,0        |
| 9 - 11  | M.long. cervicis, Rind    | 22,5    | 1,2        | 19,1       | 87,5        |
| 12 - 14 | M.long. dorsi, Rind       | 25,7    | 1,4        | 22,6       | 36,0        |
| 15 - 16 | M.gracilis, Rind          | 26,1    | 1,4        | 22,1       | 17,0        |
| 17 - 18 | M.psoas, Rind             | 27,0    | 1,6        | 19,5       | 21,0        |
| 19 - 20 | M.glutaeobiceps, Rind     | 26,1    | 1,4        | 21,9       | 30,0        |
| 21 - 22 | "                         | 26,8    | 1,5        | 21,2       | 29,0        |
| 23      | Zwerchfellpfeiler, Rind   | 23,7    | 1,3        | 23,1       | 92,0        |
| 24      | "                         | 26,0    | 1,5        | 22,3       | 34,0        |
| 25      | "                         | 26,3    | 1,6        | 22,1       | 78,0        |
| 26 - 27 | "                         | 26,4    | 1,5        | 22,3       | 68,0        |
| 28 - 29 | "                         | 29,1    | 1,5        | 22,2       | 69,5        |
| 30 - 31 | "                         | 33,2    | 2,0        | 22,9       | 75,0        |
| 32 - 36 | M.long. dorsi, Schwein    | 27,0    | 1,4        | 19,6       | 23,0        |
| 37      | Herzmuskel, Rind          | 25,0    | 1,1        | 19,1       | 12,0        |
| 38      | "                         | 25,1    | 1,7        | 18,6       | 23,0        |
| 39 - 40 | "                         | 24,0    | 1,8        | 17,8       | 20,0        |
| 41 - 42 | "                         | 23,5    | 1,1        | 18,5       | 23,0        |
| 43 - 44 | "                         | 20,2    | 1,2        | 17,8       | 23,5        |
| 45 - 46 | "                         | 27,1    | 2,1        | 19,3       | 52,0        |
| 47      | Herzmuskel, Schwein       | 24,7    | 1,3        | 18,2       | 26,0        |
| 48      | "                         | 20,5    | 1,5        | 19,1       | 22,0        |
| 49      | "                         | 24,4    | 1,6        | 20,9       | 15,0        |
| 50      | Leber, Rind               | 23,1    | 1,6        | 20,1       | 33,0        |
| 51      | "                         | 29,4    | 1,5        | 19,7       | 30,0        |
| 52 - 53 | "                         | 21,4    | 1,5        | 19,1       | 32,0        |
| 54      | Leber, Schwein            | 29,9    | 1,5        | 19,2       | 39,0        |
| 55      | Zwerchfellpfeiler, Rind   | 27,1    | 1,6        | 22,5       | 61,0        |
| 56      | Herzmuskel, Rind          | 24,1    | 1,3        | 17,6       | 26,0        |

entfernt werden. Bei Verwendung des Waring Blendor wird 30 Sekunden bei maximaler Drehzahl gearbeitet. Vom erhaltenen Homogenat werden für die Bestimmung von TS, Asche, Zink und Protein ebenfalls Anteile abgezweigt.

Zweimal 400 ml werden der Fraktionation unterworfen, sodaß die Zellfraktionierung doppelt vorliegt (Ergebnis = Mittelwert). Durch Zentrifugation bei zunächst 500 g für 10 Min. erhält man die erste, die nucleomyofibrilläre Fraktion, durch Zentri-

| Aufarbeitung der Probe                                             | Bestimmungen    |                               |
|--------------------------------------------------------------------|-----------------|-------------------------------|
|                                                                    | Probe-<br>menge | Art der Bestimmung            |
| <u>ORGAN</u>                                                       | 2 g<br>2 g      | TS(g); A(g); ad 20 ml; Zn(ug) |
| 50 g, mit Medium<br>ad 1000,<br>homogenisiert                      | 3 g<br>3 g      | Makrokjeldahl, Protein (g)    |
| <u>HOMOGENAT</u>                                                   | 20 ml<br>20 ml  | TS(g); A(g); ad 20 ml; Zn(ug) |
| Fraktionation<br>in der Zentri-<br>fuge von je<br>400 ml Homogenat | 2 ml<br>2 ml    | Mikrokjeldahl, Protein (g)    |
| <u>1. Fraktion</u>                                                 | 20 ml<br>20 ml  | TS(g); A(g); ad 20 ml; Zn(ug) |
| mit A.dest. ad 60 ml                                               | 1 ml<br>1 ml    | Mikrokjeldahl, Protein (g)    |
| <u>2. Fraktion</u>                                                 | 20 ml<br>20 ml  | "                             |
| mit A.dest. ad 60 ml                                               | 5 ml<br>5 ml    | "                             |
| <u>3. Fraktion</u>                                                 | 75 ml<br>75 ml  | "                             |
| mit A.dest. ad 400ml                                               | 5 ml<br>5 ml    | "                             |

Abbildung 31: Schematische Darstellung der Einzelmethodik bei der Zellfraktionierung

fugation bei 10.000 g für 20 Min. die zweite, die Mitochondrienfraktion. Der Überstand stellt die 3., die Lösliche oder Mikrosomen- Fraktion dar.

Bei zwei Proben wird die 1. Fraktion zusätzlich mehrfach mit 400 ml Aqua dest. und EDTA (0,001M) gewaschen, sowie die 3. Fraktion einer Proteinfällung mit  $\overline{\text{aa}}$  Trichloressigsäure (20%) unterworfen.

Ergebnisse stellen immer den Mittelwert von Doppelproben dar. Aus der Konzentration einer Substanz und dem Naßgewicht der Fraktion kann auf die absolute Menge der Substanz in der Fraktion geschlossen werden. Die relativen Mengen in % resultieren aus

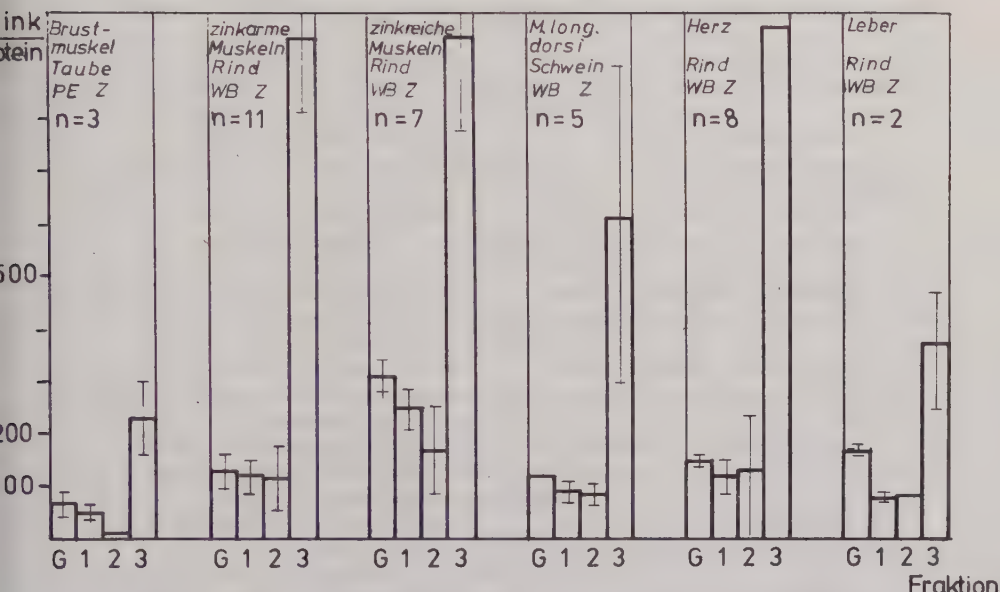


Abbildung 32:  $\mu\text{g}$  Zink/g Protein in Geweben und Zellfraktionen. Die Art der Homogenisation ist als PE = Potter-Elvehjem, WB = Waring Blendor und Z = Zuckermedium (0,25M) angegeben. Die Länge des Balkens symbolisiert die Größe  $\mu\text{g}$  Zink/g Protein in Gewebe (G) und 1., 2. und 3. Fraktion.

dem Vergleich der Fraktionen mit dem Homogenat, das gleich 100 % gesetzt wird. Die Menge der Substanz in der Fraktion ergibt sich aus dem Ansatz: 
$$\frac{\text{Naßgewicht der Fraktion} \times \text{Konz. der Substanz}}{\text{Probemenge}} ;$$

weiter die prozentuale Verteilung der Substanz aus dem Ansatz:

$$\frac{\text{Menge der Substanz in der Fraktion} \times 100}{\text{Menge der Substanz im Homogenat}} ;$$

### 3. Besprechung der Ergebnisse

Abbildung 32 vermittelt einen Überblick über den Zinkgehalt bezogen auf den Proteingehalt von Geweben und ihren Zellfraktionen. Die prozentuale Verteilung von Zink und Protein in den drei isolierten Zellfraktionen geht aus Abbildung 33 (Seite 108) hervor. Die Einzelergebnisse der Zellfraktionierungen sind, statistisch zusammengefasst, der Tabelle 46 (Seite 109) zu entnehmen.

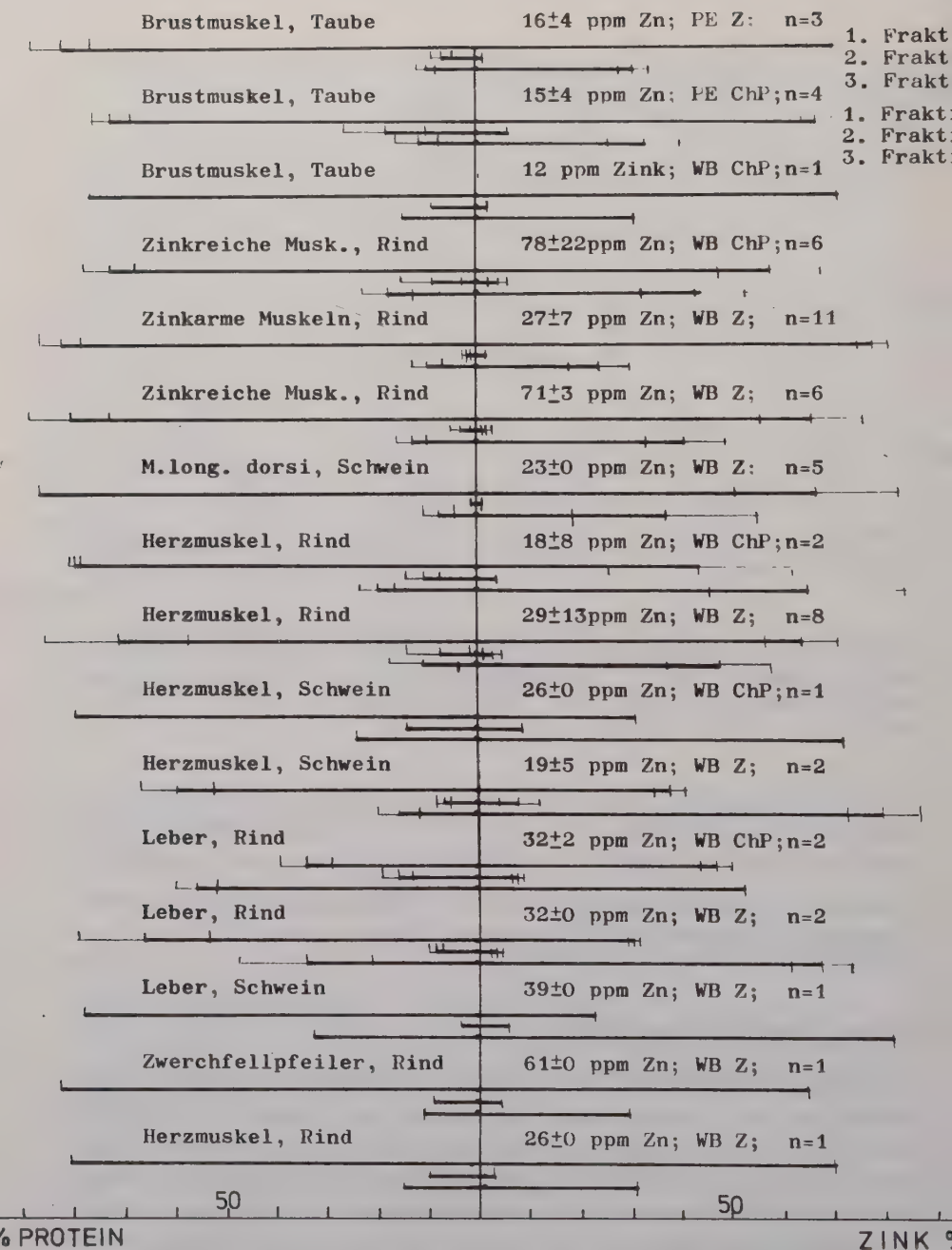


Abbildung 33: Prozentuale Verteilung des Zinks und des Proteins auf die drei Zellfraktionen. Von oben nach unten Zellkernfraktion, Mitochondrienfraktion und lösliche Fraktion.

Tabelle 46: Ergebnisse der Zellfraktionierung. Für die Fraktionen 1, 2 und 3 werden die %uale Verteilung von Asche, Protein und Zink im Homogenat, sowie die Konzentrationen Zn/Asche und Zn/Protein in den Fraktionen aufgeführt. Die Homogenisation des Gewebes (G) erfolgt mit dem Waring Blendor (WB) oder dem Potter Elvehjem (PE) in Medium nach Cappell und Perry (ChP) oder in Zuckerlösung (Z)

| Probe,<br>ppm Zink & Zs<br>Behandlung<br>(Nr. der<br>Probenliste) | er-<br>ge-<br>ben<br>in | % in den Fraktionen |      |           |     |           |      | avg Zink  |      | avg Zink  |      |
|-------------------------------------------------------------------|-------------------------|---------------------|------|-----------|-----|-----------|------|-----------|------|-----------|------|
|                                                                   |                         | Asche               |      | Protein   |     | Zink      |      | g Asche   |      | g Protein |      |
|                                                                   |                         | $\bar{x}$           | s    | $\bar{x}$ | s   | $\bar{x}$ | s    | $\bar{x}$ | s    | $\bar{x}$ | s    |
| Brustmuskel                                                       | G                       |                     |      |           |     |           |      | 897       | 234  | 68,0      | 22,0 |
| Taube 16±4                                                        | 1.                      | 75,0                | 2,0  | 83,3      | 6,7 | 70,0      | 2,0  | 842       | 241  | 52,0      | 12,0 |
| PE Z                                                              | 2.                      | 0,5                 | 0,4  | 8,7       | 3,5 | 0,9       | 0,6  | 2540      | 2055 | 6,1       | 4,2  |
| (2;4;6)                                                           | 3.                      | 29,3                | 1,6  | 9,7       | 3,1 | 31,3      | 2,7  | 954       | 188  | 228,0     | 73,0 |
| Brustmuskel                                                       | G                       |                     |      |           |     |           |      | -         |      | 66,7      | 17,6 |
| Taube 15±4                                                        | 1.                      | -                   |      | 73,5      | 5,5 | 67,8      | 2,2  | -         |      | 61,2      | 14,2 |
| PE ChP                                                            | 2.                      | -                   |      | 18,2      | 8,8 | 5,5       | 5,5  | -         |      | 19,5      | 12,8 |
| (1;3;5;7)                                                         | 3.                      | -                   |      | 11,5      | 4,4 | 32,8      | 7,5  | -         |      | 201,7     | 70,4 |
| Brustmuskel                                                       | G                       |                     |      |           |     |           |      | -         |      | 51,0      |      |
| Taube 12                                                          | 1.                      | -                   |      | 77,0      |     | 71,0      |      | -         |      | 46,0      |      |
| WB ChP                                                            | 2.                      | -                   |      | 9,0       |     | 1,3       |      | -         |      | 7,4       |      |
| 8)                                                                | 3.                      | -                   |      | 15,0      |     | 31,0      |      | -         |      | 115,0     |      |
| zinkreiche M G                                                    |                         |                     |      |           |     |           |      | -         |      | 360       | 104  |
| Rind 78±22                                                        | 1.                      | -                   |      | 73,3      | 5,8 | 57,8      | 10,8 | -         |      | 277       | 69   |
| WB ChP                                                            | 2.                      | -                   |      | 9,5       | 3,9 | 4,2       | 2,3  | -         |      | 167       | 103  |
| (9-11;23-25)                                                      | 3.                      | -                   |      | 18,6      | 4,5 | 43,0      | 10,7 | -         |      | 899       | 439  |
| zinkarme M. G                                                     |                         |                     |      |           |     |           |      | 1910      | 540  | 131       | 31   |
| Rind 27±7                                                         | 1.                      | 82,0                | 3,2  | 82,9      | 4,9 | 77,7      | 3,4  | 1827      | 573  | 124       | 31   |
| WB Z                                                              | 2.                      | 1,3                 | 0,8  | 2,0       | 1,4 | 1,9       | 2,1  | 2551      | 1722 | 122       | 66   |
| (12-22)                                                           | 3.                      | 20,8                | 3,9  | 10,0      | 2,9 | 24,6      | 8,0  | 2204      | 620  | 941       | 132  |
| zinkreiche M G                                                    |                         |                     |      |           |     |           |      | 4197      | 287  | 313       | 26   |
| Rind 71±3                                                         | 1.                      | 70,7                | 8,4  | 81,0      | 9,1 | 65,8      | 9,8  | 3931      | 771  | 249       | 43   |
| WB Z                                                              | 2.                      | 5,5                 | 3,3  | 3,4       | 2,3 | 1,7       | 1,1  | 1987      | 868  | 172       | 95   |
| (26-31)                                                           | 3.                      | 29,7                | 15,2 | 13,3      | 3,7 | 40,8      | 9,3  | 5692      | 2106 | 958       | 289  |
| Long. dorsi                                                       | G                       |                     |      |           |     |           |      | 1679      | -    | 120       | -    |
| Schw. 23±0                                                        | 1.                      | 73,0                | 9,1  | 87,0      | 1,4 | 67,0      | 16,7 | 1521      | 232  | 93        | 23   |
| WB Z                                                              | 2.                      | 0,5                 | 0,2  | 1,2       | 0,3 | 0,9       | 0,4  | 5722      | 5397 | 88        | 19   |
| (32-36)                                                           | 3.                      | 27,2                | 14,0 | 8,0       | 2,8 | 36,2      | 18,7 | 2318      | 716  | 612       | 336  |
| Herzmuskel                                                        | G                       |                     |      |           |     |           |      | -         |      | 103,5     | 53,0 |
| Rind 18±8                                                         | 1.                      | -                   |      | 79,5      | 0,7 | 43,5      | 19,1 | -         |      | 50,0      | 5,7  |
| WB ChP                                                            | 2.                      | -                   |      | 11,0      | 1,4 | 3,0       | 0,0  | -         |      | 26,0      | 11,3 |
| (37;38)                                                           | 3.                      | -                   |      | 19,5      | 3,5 | 65,0      | 21,0 | -         |      | 316       | 277  |
| Herzmuskel                                                        | G                       |                     |      |           |     |           |      | 2304      | 437  | 151       | 15   |
| Rind 29±13                                                        | 1.                      | 73,7                | 8,4  | 72,3      | 9,9 | 57,6      | 7,6  | 1859      | 438  | 122       | 25   |
| WB Z                                                              | 2.                      | 5,6                 | 3,2  | 8,6       | 6,6 | 2,9       | 1,4  | 1346      | 650  | 127       | 156  |
| (40;41;44;46)                                                     | 3.                      | 45,9                | 15,3 | 10,8      | 6,6 | 48,9      | 9,8  | 2549      | 290  | 969       | 777  |
| Herzmuskel                                                        | G                       |                     |      |           |     |           |      | -         |      | 145       |      |
| Schw. 26±0                                                        | 1.                      | -                   |      | 80        |     | 31        |      | -         |      | 56        |      |
| WB ChP                                                            | 2.                      | -                   |      | 14        |     | 9         |      | -         |      | 94        |      |
| (47)                                                              | 3.                      | -                   |      | 24        |     | 72        |      | -         |      | 434       |      |

Fortsetzung Tabelle 46 .

| Probe,<br>ppm Zink<br>Behandlung<br>(Nr. der<br>Probenliste) | er-<br>ge-<br>ben<br>in | % in den Fraktionen |      |           |     |           |     | <u>µg Zink</u><br>g Asche |     | <u>µg Zink</u><br>g Protein |      |
|--------------------------------------------------------------|-------------------------|---------------------|------|-----------|-----|-----------|-----|---------------------------|-----|-----------------------------|------|
|                                                              |                         | Asche               |      | Protein   |     | Zink      |     |                           |     |                             |      |
|                                                              |                         | $\bar{x}$           | s    | $\bar{x}$ | s   | $\bar{x}$ | s   | $\bar{x}$                 | s   | $\bar{x}$                   | s    |
| Herzmuskel                                                   | G                       |                     |      |           |     |           |     | 1044                      | 292 | 104                         | 34   |
| Schw. 19±5                                                   | 1.                      | 64,5                | 6,4  | 60,0      | 7,0 | 37,5      | 3,5 | 607                       | 172 | 63                          | 8    |
| WB Z                                                         | 2.                      | 0,7                 | 0,1  | 7,0       | 1,4 | 7,5       | 4,9 | 3543                      | -   | 114                         | 87   |
| (48;49)                                                      | 3.                      | 49,5                | 13,4 | 16,0      | 4,2 | 80,0      | 7,0 | 1685                      | 135 | 548                         | 270  |
| Leber                                                        | G                       |                     |      |           |     |           |     | -                         |     | 161,0                       | 3,5  |
| Rind 32±2                                                    | 1.                      | -                   |      | 33,5      | 4,9 | 47,0      | 2,8 | -                         |     | 227,0                       | 42,0 |
| WB ChP                                                       | 2.                      | -                   |      | 16,0      | 2,8 | 7,5       | 0,7 | -                         |     | 76,0                        | 7,8  |
| (50;51)                                                      | 3.                      | -                   |      | 56,0      | 4,2 | 53,0      | 8,9 | -                         |     | 152,0                       | 7,8  |
| Leber                                                        | G                       |                     |      |           |     |           |     | 2133                      | -   | 168                         | -    |
| Rind 32±0                                                    | 1.                      | 25,5                | 2,1  | 66,5      | 9,9 | 30,5      | 0,7 | 2516                      | 183 | 78                          | 13   |
| WB Z                                                         | 2.                      | 4,9                 | 0,1  | 7,5       | 0,8 | 3,5       | 0,7 | 1530                      | 83  | 79                          | 10   |
| (52;53)                                                      | 3.                      | 75,5                | 6,4  | 33,5      | 9,9 | 68,5      | 4,9 | 1940                      | 18  | 369                         | 123  |
| Leber                                                        | G                       |                     |      |           |     |           |     | 2229                      |     | 205                         |      |
| Schw. 39±0                                                   | 1.                      | 31                  |      | 78        |     | 23        |     | 1650                      |     | 60                          |      |
| WB Z                                                         | 2.                      | 6                   |      | 3         |     | 6         |     | 2238                      |     | 412                         |      |
| (54)                                                         | 3.                      | 65                  |      | 32        |     | 82        |     | 2813                      |     | 526                         |      |
| Zwerchfell                                                   | G                       |                     |      |           |     |           |     | 3667                      |     | 266                         |      |
| Rind 61±0                                                    | 1.                      | 72                  |      | 83        |     | 65        |     | 3319                      |     | 208                         |      |
| WB Z                                                         | 2.                      | 9                   |      | 9         |     | 4         |     | 1635                      |     | 118                         |      |
| (55)                                                         | 3.                      | 22                  |      | 11        |     | 30        |     | 5013                      |     | 725                         |      |
| Waschen der                                                  |                         |                     |      |           |     |           |     |                           |     |                             |      |
| 1. Fraktion                                                  |                         |                     |      |           |     |           |     |                           |     |                             |      |
| mit A. dest.                                                 |                         |                     |      |           |     |           |     |                           |     |                             |      |
| ad 400 ml                                                    |                         |                     |      |           |     |           |     |                           |     |                             |      |
| zweimal                                                      |                         |                     |      |           |     |           |     | 2286                      |     | 102                         |      |
| viermal                                                      |                         |                     |      |           |     |           |     | -                         |     | 72                          |      |
| sechsmal                                                     |                         |                     |      |           |     |           |     | -                         |     | 78                          |      |
| Fällung der                                                  |                         |                     |      |           |     |           |     |                           |     |                             |      |
| 3. Fraktion                                                  |                         |                     |      |           |     |           |     |                           |     |                             |      |
| aa TCE (20%)                                                 |                         |                     |      |           |     |           |     |                           |     | 36000                       |      |
| Herzmuskel                                                   | G                       |                     |      |           |     |           |     | 2210                      |     | 143                         |      |
| Rind 26±0                                                    | 1.                      | 72                  |      | 81        |     | 70        |     | 2147                      |     | 123                         |      |
| WB Z                                                         | 2.                      | 4                   |      | 10        |     | 3         |     | 1656                      |     | 43                          |      |
| (56)                                                         | 3.                      | 29                  |      | 15        |     | 31        |     | 2360                      |     | 296                         |      |
| Waschen der                                                  |                         |                     |      |           |     |           |     |                           |     |                             |      |
| 1. Fraktion                                                  |                         |                     |      |           |     |           |     |                           |     |                             |      |
| mit A.d.                                                     |                         |                     |      |           |     |           |     |                           |     |                             |      |
| zweimal                                                      |                         |                     |      |           |     |           |     | 1678                      |     | 79                          |      |
| viermal                                                      |                         |                     |      |           |     |           |     | 1590                      |     | 106                         |      |
| mit 0,001M                                                   |                         |                     |      |           |     |           |     |                           |     |                             |      |
| EDTA                                                         |                         |                     |      |           |     |           |     | 1571                      |     | 110                         |      |

Die Gewinnung der 1. und 3. Fraktion bereitet bei keinem Gewebetyp Schwierigkeiten. Die 2., die Mitochondrienfraktion, fällt z.B. in *M.longissimus* und *M.psoas* häufig nicht umfangreich genug aus, um die beabsichtigten Bestimmungen durchführen zu können. Dagegen sind im *M.pectoralis major* der Taube, ferner in Leber und Herzmuskel von Rind und Schwein auswertbare Mengen an Mitochondrien vorhanden.

Unterschied der Gewebe: Bei der angewendeten Fraktionierung sind die myofibrillären Proteine in der 1. Fraktion enthalten. Mehr noch bei Zucker- als bei KCl-Medium findet sich Protein in dieser nucleomyofibrillären Fraktion. Demgegenüber werden die Proteine der Leberzelle in erhöhtem Maße in der 3. Fraktion angetroffen. Zink ist bei fast allen untersuchten Geweben größtenteils in der 1. Fraktion gebunden. Nur im Herzmuskel des Schweines und teils des Rindes, sowie in den Lebergeweben, ergibt sich in der 3. Fraktion die größte Menge an Zink.

Der Unterschied der Relation Zink/Protein ist in der 1. und 3. Fraktion von Lebergewebe bedeutend geringer als beim Muskel (s. Abb. 32, S. 107). Gesamtmuskelgewebe enthält mehr  $\mu\text{g Zn/g Prot.}$  als seine nucleomyofibrilläre Fraktion, weshalb das Zink in den Myofibrillen größtenteils locker gebunden zu sein scheint. Andererseits hat es den Anschein, daß zinkreiche Muskulatur des Rindes Zink auch vermehrt an myofibrilläre Proteine gebunden enthält.

Homogenisation mit dem Gerät nach Potter-Elvehjem ergibt in der 2. Fraktion eine gute Proteinausbeute (siehe Abb. 33, S. 108). Durch den Waring Blendor werden möglicherweise Zellorganellen zerstört. Mit dem KCl-Medium erhält man in der 2. Fraktion eine größere Proteinausbeute als bei Verwendung des Zuckermediums. Das KCl-Medium erweist sich als günstig für Mitochondrienisolationen. Die 1. Fraktion scheint bei KCl-Medium weniger reich an Proteinen zu sein als bei Einsatz des Zuckermediums; möglicherweise gehen in dem Elektrolytmedium Proteine in Lösung. Bei Benützung des KCl-Mediums wird in der 3. Fraktion mehr Zinkgefunden als bei Verwendung des Zuckermediums: KCl scheint dabei das Zn aus seinen zellulären Strukturen in die lösliche Fraktion zu verdrängen.

Abbildung 34 zeigt die Veränderung des Zinkgehaltes im Protein der nucleomyofibrillären Fraktion von Herzmuskel und Zwerchfellpfeiler des Rindes nach mehrmaligem Waschen mit Aqua dest. oder 0,001M EDTA. Mehrmaliges Waschen der 1. Fraktion von

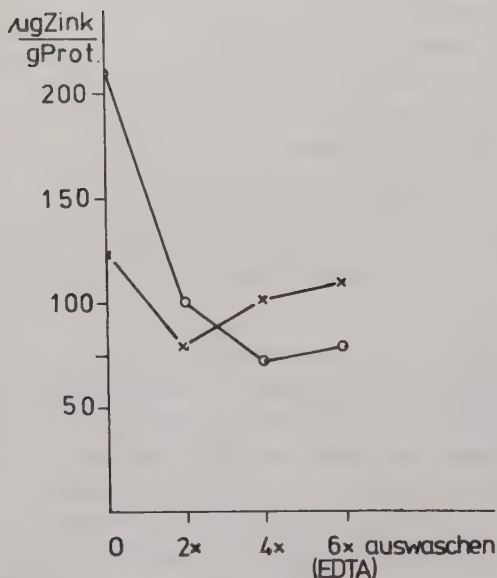


Abbildung 34: Veränderung des Zinkgehaltes der nucleomyofibrillären Fraktion nach Waschen mit Aqua dest. (viermal) und anschließend mit 0,001 M EDTA (zweimal).  
 ○ — Zwerchfellpfeiler, Rind;  
 x — Herzmuskel, Rind.

Muskelgewebe führt, wie die Abbildung erkennen läßt, zu einer Abnahme der Relation  $\mu\text{g Zn/g Protein}$ . Sie resultiert vermutlich aus der Entfernung der Zellkerne, denn der Wert  $\mu\text{g Zn/g Prot.}$  fällt im reinen Actomyosin (der folgenden Versuche 3 u. 4) etwas geringer aus. Ein nach sechs Ausfällungen mit  $\text{H}_2\text{O}$  oder Behandlung mit EDTA beobachteter Anstieg des Zinkgehaltes überrascht. Der Wert von 78 - 110  $\mu\text{g Zn/g Protein}$  scheint sich auf die gleiche Höhe einzupendeln wie im extrahierten myofibrillären Protein der folgenden Versuche 3 und 4.

Ausfällung der Proteine aus der 3. Fraktion mit 10 %iger Trichloressigsäure verändert nicht den Zinkgehalt des Überstandes. Die ausgefällten wasserlöslichen Proteine binden Zn nicht (s. Tab. 46, Seite 110).

#### 4. Diskussion

Die Bestimmungen von TS, Asche, Protein und Zink (s. Probenliste Tab. 45, Seite 105) geben mit der Literatur vergleichbare Werte (s. Tab. 7, Seite 26). Den Ergebnissen ist zu entnehmen, daß

dunkle Muskeln mehr Zink enthalten als helle. Eine Sonderstellung nehmen die zinkarmen, aber dunklen Mm.psoas des Rd., pectoralis der Taube und die Herzmuskulatur von Rind und Schwein ein.

In den Versuchen wurden von Zellen verschiedener Gewebe und Tierarten bei Anwendung definierter Homogenisationsbedingungen Organellenfraktionen gewonnen. Dargestellt wurden 1) die Zellkernfraktion, die bei Muskelgewebe auch die myofibrillären Elemente und allgemein Gewebedebris, auch ganze Zellen und Bindegewebe enthält 2) die Mitochondrienfraktion, in der auch die Lysosomen vorkommen und 3) eine Fraktion des Überstandes mit den darin gelösten Eiweissen und Mineralien. Die Isolierung einer mikrosomalen Fraktion war wegen der für exakte Bestimmungen zu geringen Ausbeute nicht durchführbar.

Einen Vergleich der eigenen Ergebnisse mit Angaben aus der Literatur erleichtert Tabelle 47. In ihr sind Resultate von Zellfraktionierungsversuchen zusammengestellt.

Tabelle 47: Ergebnisse von Zellfraktionierungen aus der Literatur

| Art des Gewebes                                                 | Gesamtprobe | Kernfraktion | Mitoch.-fraktion | Mikros.-fraktion | Lösl. Fraktion | Autor                  |
|-----------------------------------------------------------------|-------------|--------------|------------------|------------------|----------------|------------------------|
| <u>Verteilung der Zellasche, in % der Asche im Homogenat</u>    |             |              |                  |                  |                |                        |
| Rattenleber                                                     | 100         | 37           | 5                | 7                | 48             | THIERS u. VALLEE (293) |
| <u>Verteilung des Zellproteins, in % des Proteins im Homog.</u> |             |              |                  |                  |                |                        |
| "                                                               | 100         | 10-15        | 20-25            | 20               | 30             | MAHLER U. CORDES (176) |
| "                                                               | 100         | 44           | 12               | 11               | 28             | THIERS u. VALLEE (293) |
| "                                                               | 100         | -            | 33               | 22               | 45             | HOGBOOM (125)          |
| Rinderherz                                                      | 100         | 88           | 0,4              | 0,19             | 10,9           | WESTER (332)           |
| <u>Verteilung des Zellzinks, in % des Zn im Homogenat</u>       |             |              |                  |                  |                |                        |
| Rattenleber                                                     | 100         | 37,2         | 4,6              | 12,9             | 43,2           | THIERS u. VALLEE (293) |
| Rinderherz                                                      | 100         | 72-80        | 0,6-1,2          | 0,07-0,09        | 17-21          | WESTER (332)           |
| <u>µg Zink/g Protein</u>                                        |             |              |                  |                  |                |                        |
| Rattenleber                                                     | 125         | 176          | 56               | 224              | 271            | THIERS U. VALLEE (293) |
| Rinderherz                                                      | 53,5-72,6   | 48,5-64,4    | 76,4-104,0       | 26,3-39,1        | 107,0-157,0    | WESTER (332)           |

Die in Rinderleber gefundene Proteinverteilung (Irobe 50, 51) ist den Ergebnissen bei Rattenleber von THIERS u. VALLEE (293) in etwa vergleichbar. In Rinderherzen ergaben die eigenen Fraktionierungen eine größere 2. Fraktion als sie WESTER erreicht hatte. Allgemein wurde in der 3. Fraktion ein größerer Teil des Zellzinks gefunden als in bisher veröffentlichten Untersuchungen. Wie in den eigenen Untersuchungen wurde auch von WESTER (332) ermittelt, daß die nucleomyofibrilläre Fraktion weniger Zink im Protein enthält als das Gesamtprotein. Die absoluten Werte waren bei diesem Autoren aber allgemein niedriger als die eigener Untersuchungen. Der für Mitochondrienprotein von THIERS u. VALLEE (293) angegebene geringe Wert von Zink konnte in der Literatur sowie in eigenen Untersuchungen nicht bestätigt werden.

Im folgenden seien einige Ursachen für Fehler bei Fraktionierungen diskutiert. DeDuve gliedert den Fraktionsationsvorgang in drei Stufen, nämlich die Zerstörung der Zelle (a), die Einteilung der Fraktionen nach der Sedimentationsgeschwindigkeit (b) und deren Analyse (c). Ebenso verläuft die gedankliche Rekonstruktion der ganzen Zelle. Jeder Schritt kann jedoch Trugschlüsse in sich bergen, z.B. hinsichtlich der Eigenschaften der Fraktionen (a), deren Reflexion auf das Homogenat (b) und der Zuordnung zu bestimmten intrazellulären Einheiten (c).

Voraussetzung für die Zellfraktionation ist (176), daß die gesuchte Eigenschaft in konstanter Menge in den Organellen angetroffen werden kann, und daß die gesuchten subzellulären Partikel in gleicher Größe und homogener Verteilung vorliegen. Trotz dieser idealisierenden Annahmen konnten mit Hilfe der Zellfraktionation Ergebnisse der Enzym- und Metall-Lokalisierung erhalten werden.

Beispiele von Irrtümern bei der Lokalisationsangabe von Zellsubstanzen werden von ALLFREY (5) beschrieben. Nach KITAYAKARA und HARMAN (149) wird durch die Homogenisation der Zellstoffwechsel grundlegend gestört. Beim Aufbrechen der Zelle läßt sich eine Beeinträchtigung der Organellen nicht verhindern. Es entstehen dabei Partikel mit veränderter Sedimentationskonstanten und Proteine diffundieren in den Überstand. Die Mikro-

somenfraktion differenziert sich ohnehin aus den zerschlagenen Membransystemen der Zelle. Weitere Fehlermöglichkeiten beinhaltet die Polymorphie der Organellen. Sie bilden sich je nach Art und Funktion des Gewebes aus; bekannt ist die Vielgestaltigkeit der Mitochondrien (4). Auch die Zusammensetzung der löslichen Fraktion wurde elektrophoretisch als uneinheitlich ermittelt (6). Als variable intrazelluläre Einschlußkörper können Glykogengranula, Fetttropfchen und zellspezifische Anteile vorkommen.

Sobald Organellen in ein verändertes Milieu kommen, diffundieren wasserlösliche Bestandteile in das Medium. Sobald die Aktivität der Ionenpumpen gestört ist verlassen Minerale ihre Bindungsstellen und Kompartimente. Fehler entstehen aber auch durch Adsorptionsvorgänge. Freigesetzte Substanzen orientieren sich entsprechen ihrer Ladung und täuschen ein verkehrtes Bild des Zellaufbaues vor (266). Außerdem ist zu bedenken, daß die Ionenzusammensetzung der Suspensionslösungen dem natürlichen Milieu der Organellen nur nahe kommt. Die Folgen sich osmotisches Schwellen, Veränderung der Sedimentation und Umverteilung von Mineralien.

Eine weitere Variable beinhaltet die Zentrifugentechnik. Auch die Autolyse beginnt bereits bei der Gewinnung der Proben. Dabei entleeren die Lysosomen ihre proteolytischen Enzyme, die vor allem in Medien mit niedrigem ph-Wert wirksam sind. Mitochondrien degenerieren häufig schon zwei Stunden post mortem (ghost of sarkosome). Bei 0°C sollen nach Untersuchungen von CHAIPELL und PERRY Mitochondrien für 10 Tage haltbar sein. Die oxydative Phosphorylierung besteht aber nur 15 Minuten weiter. (54, 273). Ihre Schädigung kommt durch die extrazelluläre Ca-konzentration zustande.

Die Vielfalt der einzelnen Gewebekomponenten macht es oft unmöglich, einen einzigen Zelltyp exakt anzusprechen. Fast immer sind Verunreinigungen von Bindegewebe und Blut vorhanden. Verschiedene Fraktionen lassen sich weiter in Subfraktionen zerlegen, Mitochondrien z.B. in Membrankomponenten. Neuere Modelle des Zellaufbaues betrachten die Zelle nicht mehr als "Sack voller Organellen" (128, 268), sondern gehen von einer Zerlegung in Kompartimente aus.

### III. Verteilung des Zinks in Eiweißfraktionen des Skelettmuskels

#### 1. Problemstellung

In weiteren Versuchen sollte die Verteilung des Zinks speziell in Eiweißfraktionen von Skelettmuskeln und vergleichend von Herzmuskeln untersucht werden. Sie interessieren vor allem aus fleischtechnologischen Gründen. Möglicherweise liefern sie Anhaltspunkte für das Verhalten verschiedener zellulärer Eiweißfraktionen im postmortalen Muskel.

Es soll dabei die Menge des Zinks in den sarkoplasmatischen und myofibrillären Eiweißkörpern mit dem Proteingehalt (Kjeldahl-N  $\times$  6,25) in Relation gesetzt werden. Damit ist beabsichtigt, Hinweise auf die Stärke der Zinkbindung zu erhalten. Die Versuchsbedingungen werden zu diesem Zwecke in folgender Weise variiert: Zeit post mortem (a), Extraktionsbedingungen (Homogenisation, Zeit, Medium, Fällungen) (b), Zink- und Proteingehalt der Probe (c), Tierart (d) und die Art des Muskels (e).

#### 2. Methodik

Den Versuchsaufbau und den methodischen Verlauf der Einzelschritte geben die Abbildung 35 (Seite 116) und 36 (Seite 117) wieder.

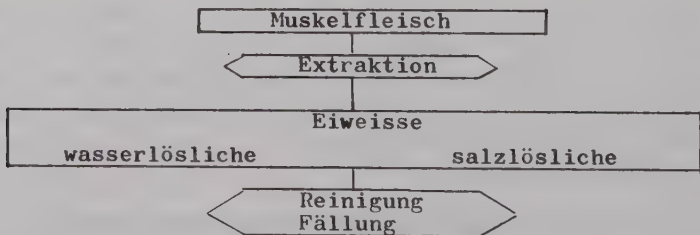


Abbildung 35: Prinzip der Methodik

| Analysengang und<br>Aufarbeitung der<br>Probe                                                | Bestimmungen          |                          |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|--------------------------|
|                                                                                              | Größe<br>der<br>Probe | Art<br>der<br>Bestimmung |
| Probe (circa 170 g Fleisch)                                                                  | 5-10 g                | TS, Asche, Zn            |
| Fleischwolf                                                                                  | 3-6 g                 | Protein                  |
| <u>Wasserlösliche Proteine</u>                                                               |                       |                          |
| 50 g Fleisch + 200 Aquadest.                                                                 |                       |                          |
| Waring Blendor, 1 Min.                                                                       |                       |                          |
| Extraktion, 6 Stunden bei 4°C                                                                |                       |                          |
| Zentrifugation, 10 Min. bei 1000 g                                                           |                       |                          |
| wasserlösl. Protein im Überstand                                                             | 50 ml                 | Zn (ca. 200-300 µg)      |
|                                                                                              | 50 ml                 | Prot. (ca. 0,4 g)        |
| <u>Actomyosin</u>                                                                            |                       |                          |
| 50 g Fleisch + 200 ml Weber-Edsall                                                           |                       |                          |
| Waring Blendor, 2 Min.                                                                       |                       |                          |
| Extraktion, 24 Std. bei 4°C, unter<br>gelegentlichem Umrühren                                |                       |                          |
| Auffüllen ad 400 mit Weber-Edsall                                                            |                       |                          |
| Zentrifugation, 20 Min. bei 10.000 g                                                         |                       |                          |
| Bodenkörper verwerfen                                                                        |                       |                          |
| Verdünnen des Überstandes auf das Zehn-<br>fache mit kaltem Aqua dest.                       |                       |                          |
| Ausgefälltes Actomyosin abgetrennt bei<br>15.000 g für 20 Minuten                            | 5-20 ml               | Zn (ca 5-10 µg)          |
|                                                                                              | 5-20 ml               | Prot. (0,1-0,2g)         |
| <u>Myosin</u>                                                                                |                       |                          |
| Zerkleinerung des Fleisches nur mit<br>dem Wolf, sonst gleiche Methode wie<br>bei Actomyosin |                       |                          |
|                                                                                              | " "                   | " "                      |

Abbildung 36: Einzelschritte der Methodik

An Geräten und Reagenzien stehen zur Verfügung:

- Fleischwolf, Starmix, Waring Blendor
- Zentrifuge (Christ Zeta 20)
- Kjeldahl-Reagenzien und -Geräte
- Geräte und Reagenzien der Zinkbestimmung
- Weber-Edsall-Lösung: 0,6M KCl  
0,01M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
0,04M NaHCO<sub>3</sub>

Zur Einstellung des pH-Wertes: 0,1N NaOH und 0,1N HCl

Die Proben der Schweine- und Rindermuskeln wurden sofort nach der Schlachtung entnommen und auf Eis gekühlt.

#### 1. Darstellung der wasserlöslichen Eiweisse:

Zu ihrer Darstellung werden 50 g gewolfte Fleisch mit 200 ml Aqua dest. 1 Minute im Starmix homogenisiert. Nach Einstellung

des gewünschten pH mit 0,1N NaOH oder 0,1N HCl und der Extraktion (6 Stunden bei 4°C) wird der unlösliche Rückstand verworfen. Im Überstand werden Volumen, sowie in Doppelproben Gehalt an N und Zn bestimmt (Eiweiß = Kjeldahl-N x 6,25) .

## 2. Darstellung des Actomyosins

Sie geschah nach der Methode von SZENT-GYÖRGYI (289).

50 g gewolfen Fleisches werden dabei unter Zusatz von 200 ml Weber-Edsall-Lösung ( $I=0,69$ ) für 2 Minuten intensiv im Waring Blendor homogenisiert. Die Extraktion des Actomyosins erfolgt bei eingestelltem pH 24 Stunden lang unter gelegentlichem Umrühren. Zur Viskositätserniedering im Extrakt wird dann mit Weber-Edsall-Lösung ad 400 ml aufgefüllt und das Stromaeiweiß abzentrifugiert. Die Reinigung des Actomyosins im Überstand erfolgt durch Zugabe des zehnfachen Volumens an Aqua dest., wodurch die Ionenstärke auf ca. 0,07 fällt. Durch Zentrifugation bei 15.000 g erhält man daraus das gereinigte Actomyosin. Es werden bis zu vier Reinigungsschritte durchgeführt.

Aus dem Volumen des Geles der ersten Ausfällung und dem Gehalt an N und Zn ermittelt man die prozentuale Extrahierbarkeit als "% Actomyosin-N vom Gesamt-N" oder "% Zn vom Gesamt-Zn".

## 3. Darstellung des Myosins

Lösungen hoher Ionenstärke extrahieren bei nur grober Zerkleinerung des Fleisches nur Myosin, bei intensiver Homogenisierung wird aber auch ein Teil des Actins mitfreigesetzt. Zur Myosinengewinnung wurden 50 g schlachtfrischen Fleisches ohne weitere Homogenisierung, nur gewolft der gleichen Extraktion unterworfen wie bei der Actomyosindarstellung.

## 3. Ergebnisse

Über die Ergebnisse der Protein- und Zinkbestimmungen unterrichtet Tabelle 48 (Seite 119). In ihr sind die extrahierten Proteinmengen in % des Gesamtproteins, das extrahierte Zink in % des Gesamtzinks, sowie die Relation  $\mu\text{g Zn/g Prot.}$  in den extrahierten Eiweißen angegeben.

Tabelle 48: Ergebnisse der Protein- und Zinkextraktion. Extrahiertes Protein in % des Gesamt-Rohprotein und extrahiertes Zink in % des Gesamtzink, ferner  $\mu\text{g}$  Zink/g Protein im extrahierten Protein

| Nr.                         | Probe und extrahiertes Protein | Zeit p.m. | pH | extrah. Protein in % | extrah. Zink in % | Prot % | Zink ppm | $\mu\text{g}$ Zink/g Protein |
|-----------------------------|--------------------------------|-----------|----|----------------------|-------------------|--------|----------|------------------------------|
| <b>M.long.cervicis, Rd.</b> |                                |           |    |                      |                   |        |          |                              |
| 1                           | Sarkopl. Protein               | 1 h       | -  | 19,1                 | 81,6              | 23,0   | 38       | 165                          |
| 2                           | "                              |           |    | 18,3                 | 75,3              |        |          | 704                          |
| 3                           | "                              |           |    | 15,6                 | 67,2              |        |          | 680                          |
| 4                           | Actomyosin                     | 1 h       | -  | 12,2                 | 3,8               |        |          | 708                          |
| 5                           | "                              |           |    | 27,8                 | 7,4               |        |          | 52                           |
| 6                           | "                              |           |    | 18,3                 | 10,3              |        |          | 43                           |
| 7                           | Myosin                         | 1 h       | -  | 13,9                 | 5,1               |        |          | 93                           |
| 8                           | "                              |           |    | 14,8                 | 1,9               |        |          | 60                           |
| 9                           | "                              |           |    | 9,6                  | 8,1               |        |          | 21                           |
| <b>M.long.dorsi, Schw.</b>  |                                |           |    |                      |                   |        |          |                              |
| 10                          | Sarkopl. Protein               | 1 h       | -  | 13,7                 | 77,2              | 19,0   | 31       | 140                          |
| 11                          | Actomyosin                     | 1 h       | -  | 9,5                  | 3,3               |        |          | 163                          |
| 12                          | Sarkopl. Protein               | 12 h      | -  | 14,7                 | 107,7             |        |          | 920                          |
| 13                          | Actomyosin                     | 12 h      | -  | 4,2                  | 0,8               |        |          | 57                           |
| <b>M.long.dorsi, Schw.</b>  |                                |           |    |                      |                   |        |          |                              |
| 14                          | Sarkopl. Protein               | 1 h       | -  | 11,9                 | 66,9              | 20,2   | 30       | 149                          |
| 15                          | Actomyosin                     | 1 h       | -  | 10,9                 | 3,2               |        |          | 842                          |
| 16                          | Sarkopl. Protein               | 12 h      | -  | 8,9                  | 80,1              |        |          | 43                           |
| 17                          | Actomyosin                     | 12 h      | -  | 3,0                  | 0,9               |        |          | 1344                         |
| <b>Flexoren,vorn,Schw.</b>  |                                |           |    |                      |                   |        |          |                              |
| 18                          | Sarkopl. Protein               | 1 h       | -  | 22,4                 | 94,5              | 17,0   | 73       | 429                          |
| 19                          | Actomyosin                     | 1 h       | -  | 10,6                 | 1,8               |        |          | 1816                         |
| 20                          | Sarkopl. Protein               | 12 h      | -  | 10,5                 | 95,9              |        |          | 74                           |
| 21                          | Actomyosin                     | 12 h      | -  | 3,5                  | 0,1               |        |          | 3889                         |
| <b>M.latissimus, Schw.</b>  |                                |           |    |                      |                   |        |          |                              |
| 22                          | Sarkopl. Protein               | 96 h      | -  | 21,8                 | 56,5              | 17,4   | 79       | 13                           |
| 23                          | "                              | 96 h      | -  | 12,6                 | 56,7              |        |          | 454                          |
| 24                          | Actomyosin                     | 96 h      | -  | 9,1                  | 1,3               |        |          | 1173                         |
| 25                          | "                              | 96 h      | -  | 4,6                  | 0,4               |        |          | 2036                         |
| <b>M.long.cervicis, Rd.</b> |                                |           |    |                      |                   |        |          |                              |
| 26                          | Sarkopl. Protein               | tief      | 5  | 7,2                  | 90,0              | 22,2   | 42       | 63                           |
| 27                          | "                              | ge-       | 6  | 9,9                  | 86,2              |        |          | 37                           |
| 28                          | "                              | fro-      | 7  | 10,8                 | 52,9              |        |          | 189                          |
| 29                          | "                              | ren       | 8  | 9,9                  | 56,7              |        |          | 2360                         |
| <b>Herz, Schwein</b>        |                                |           |    |                      |                   |        |          |                              |
| 30                          | Sarkopl. Protein               | "         | 5  | 3,1                  | 75,4              | 19,6   | 26       | 1645                         |
| 31                          | "                              |           | 6  | 9,2                  | 78,5              |        |          | 925                          |
| 32                          | "                              |           | 7  | 23,5                 | 60,8              |        |          | 1081                         |
| 33                          | "                              |           | 8  | 21,4                 | 52,3              |        |          | 133                          |
| <b>Herz, Rind</b>           |                                |           |    |                      |                   |        |          |                              |
| 34                          | Sarkopl. Protein               | "         | 5  | 8,0                  | 76,5              | 17,6   | 23       | 131                          |
| 35                          | "                              |           | 6  | 10,2                 | 79,1              |        |          | 2370                         |
| 36                          | "                              |           | 7  | 19,3                 | 75,7              |        |          | 1133                         |
| 37                          | "                              |           | 8  | 14,8                 | 79,1              |        |          | 718                          |

Aus schlachtfischem Muskel isoliertes Actomyosin enthält pro Gramm Protein zwischen 21 und 140  $\mu\text{g}$  Zink, Sarkoplasmaproteine zwischen 680 und 3889  $\mu\text{g}$ .

Mit der Zeit post mortem geht die Extrahierbarkeit des Actomyosins stark zurück, die der wasserlöslichen Eiweisse in geringerem Maße. Das Zink verläßt 12 Stunden post mortem, wahrscheinlich wegen der ph-Senkung, zum größten Teil die strukturellen Proteine und wird zusammen mit den wasserlöslichen extrahiert. Die Relation Zn/Protein verringert sich deshalb im Actomyosin 12 Stunden post mortem. 96 Stunden post mortem fällt die Extrahierbarkeit des Zn mit Wasser und die des Actomyosins mit Weber-Edsall-Lösung sehr stark ab.

Abb. 37 stellt die Extraktion der Sarkoplasmaproteine und des Zinks

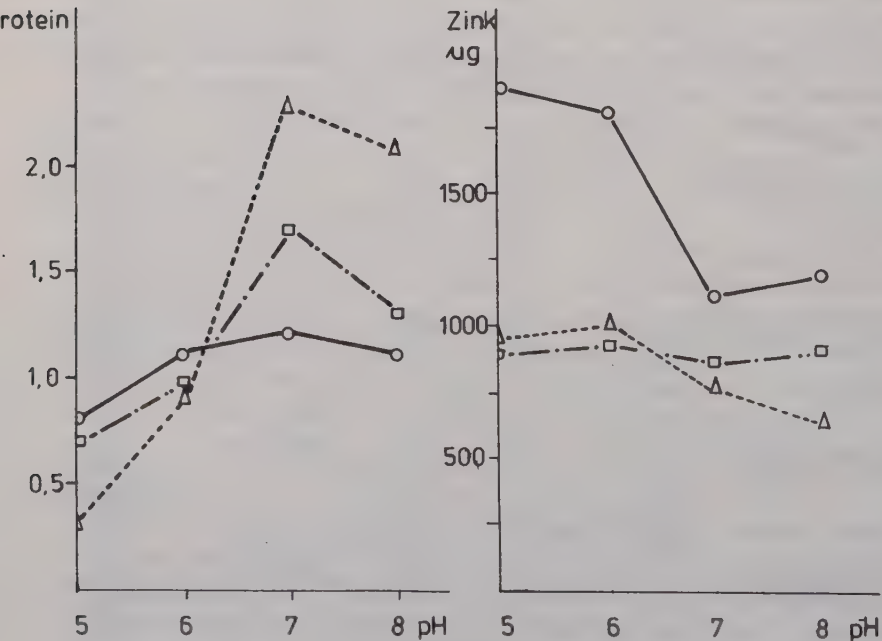


Abbildung 37: Extraktion der Sarkoplasmaproteine und des Zinks in Abhängigkeit vom pH. Aus 50 g einer Muskelprobe werden bei eingestelltem pH wässrige Extrakte gewonnen. Longissimus cervicis vom Rind  $\circ$ — $\circ$ ; Herzmuskel vom Schwein  $\Delta$ ----- $\Delta$  Herzmuskel vom Rind  $\square$ — $\square$ .

Zinks in Abhängigkeit vom pH dar. Mit der Erhöhung des pH-Wertes nimmt die Stärke der Zinkbindung an die myofibrillären Proteine erheblich zu, d.h. es kann durch Extraktion von Muskelgewebe mit Wasser nicht mehr freigesetzt werden. Die Extraktionsausbeute der sarkoplasmatischen Proteine steigt dagegen bei zunehmenden pH-Werten, wie die Abbildung 37 (Seite 120) zeigt.

Der Tabelle 48 (Seite 119) ist weiter zu entnehmen, daß zinkreiche Muskeln (Mm. flexores und latissimus vom Schwein) vermehrt lösliche Sarkoplasmaproteine enthalten. In zinkreichen Muskelgeweben ist auch der Wert  $\mu\text{g Zn/g Protein}$  bedeutend größer als in zinkarmer. Dagegen liegt der Zinkgehalt des Actomyosins von zinkreicher Muskulatur nur unwesentlich über dem von zinkarmer, d.h. der größte Teil dieser Zinkmenge ist zusammen mit den wasserlöslichen Substanzen extrahierbar.

#### 4. Diskussion

Die Extraktion von Aktomyosin durch Salzlösungen hoher Ionenstärke hängt stark vom pH-Wert ab (299), bei den Sarkoplasmaproteinen spielt aber nach SULZBACHER et al. (283), sowie KLEMENT et al. (150) der pH keine entscheidende Rolle. Auch das lösliche Nichteiweiß-N bleibt bei pH-Veränderungen konstant (150). In den eigenen Versuchen stieg dagegen bei erhöhtem pH-Wert die Extraktionsausbeute an sarkoplasmatischen Proteinen. Möglicherweise macht sich die Entfernung von dem IP auch bei diesen Proteinen bemerkbar.

BERMAN (24), CASSENS et al. (52) sowie KUONMAN et al. (159) konnten aus zinkreichen Muskeln vermehrt Sarkoplasmaproteine extrahieren. Diese Feststellung wird durch die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen bestätigt: Aus schlachtfischem M. longissimus dorsi des Schweines (31 ppm Zn) konnten vom Gesamtprotein nur 11,9 - 13,7 % Sarkoplasmaproteine extrahiert werden, aus den Mm. flexores des Schweines (73 ppm Zn) dagegen 10,5 - 22,4 %.

Die geringe Extrahierbarkeit des Zn aus 96 Stunden lang abgelagerten Fleisch erklärt sich möglicherweise in einer Zunahme der Proteinladung nach Lösung des Rigor mortis.

KLEMENT et al. (150) erhielten aus Postrigor-Fleisch Extraktionsausbeuten an myofibrillären Proteinen von 29,2 - 35,5 % des Total-N, SAYRE und BRISKEY (258) aus Schweinefleisch 24 Stunden post mortem 10 - 40 % des Total-N, FISCHER (79) nach Extraktion mit 2 %iger NaCl-Lösung aus schlachtwarmem Fleisch bis 44,5% Eiweiß u. KOTTER (157) bei Extraktion von Kaninchenmuskulatur mit 0,4M NaCl-Lösung 29,3% Eiw.-N des Muskeleiweiß-N bzw. 6,2 % Myosin-N vom Muskeleiweiß-N, weiter KHAN et al. (141) bei Extraktion von Hühnermuskeln mit Salzlösungen von I = 1,0 64,4 - 85,2 % des Gesamt-N. Nach KHAN et al. (141) nimmt in Geflügelmuskulatur das extrahierbare Actomyosin mit der Lagerung ab.

In den eigenen Untersuchungen betrugen - das Rest-N ist unberücksichtigt - die Extraktionsausbeuten an Actomyosin- bzw. Myosin-N in % vom Gesamt-N aus schlachtfrischer Rindermuskulatur 9,6 - 27,8 %, aus schlachtfrischer Schweinemuskulatur 9,5 bis 10,9 % und aus 96 Stunden abgelagertem Schweinefleisch 4,6 - 9,1 %. Zinkarmer (M.longissimus dorsi) und zinkreicher (Mm. flexores) Schweinemuskel ergab die gleichen Extraktionsausbeuten an myofibrillären Eiweißen.

SAYRE und BRISKEY (258) konnten aus Schweinefleisch 24 Stunden post mortem 18 - 23 % des Gesamt-N an sarkoplasmatischem Protein-N extrahieren, KLEMENT et al. (150) aus Rindfleisch nach Lösung des Rigors 16,1 - 18,8 % des Total-N und KOTTER (157) mit 0,4M NaCl-Lösung 23,2 % des Muskeleiweiß-N.

In eigenen Untersuchungen konnte an wasserlöslichem Stickstoff aus schlachtfrischer Rindermuskulatur 15,6 - 19,1 % vom Gesamt-N extrahiert werden, aus schlachtfrischem M.long.dorsi (Schwein, 30-31 ppm Zn) 11,9 - 13,7 %, einen etwas höheren Anteil aus den zinkreicheren Mm.flexores, und aus 96 Stunden abgelagertem Schweinefleisch 12,6 - 21,8 %.

#### IV. Zinkbindung an Actomyosin

##### 1. Problemstellung

Außerdem sollte noch durch die Veränderung des Zinkgehaltes von Actomyosin nach mehrfacher Ausfällung geprüft werden, ob sich Hinweise auf die Stabilität der Bindung des Zinks an strukturelle Muskeleiweiße ergeben.

##### 2. Methodik

Die Isolierung des Actomyosins erfolgte nach der in Versuch III, Seite 118, beschriebenen Methode. Es wurde durch Hochgeschwindigkeitszentrifugation und mehrfaches Ausfällen mit der zehnfachen Menge an Aqua dest. gereinigt. Teils fanden zur Ausfällung 0,001M EDTA und 0,1M HCl Anwendung. Nach jeder Fällung wurden im Actomyosin Zink und Protein bestimmt. Detaillierte Angaben über die Bestimmungen bringt Abb. 38.

| Probe       | Proteinbestimmung                            | Zinkbestimmung                                     |
|-------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| Actomyosin  | Mikrokeljehl<br>1 ml $\pm$ 5 - 80 mg Protein | Mikronaßveraschung<br>2 ml $\pm$ 3 - 50 $\mu$ g Zn |
| Muskelprobe | Mikrokeljdahl<br>1 ml Homogenat              | Mikronaßveraschung<br>1 ml Homogenat               |

Abbildung 38: Protein- und Zinkbestimmungen

##### 3. Ergebnisse und Diskussion

Die Actomyosine wiesen 0,5 - 8,0 % Protein und 1,5 - 24,0 ppm Zink auf. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in den Tabellen 49 und 50 (Seite 124) zusammengestellt.

Tabelle 49: Zinkgehalt von Actomyosin nach mehrfachen Ausfällungen in  $\mu$ g Zink/g Protein

| Behandlung            | n | $\bar{x}$ | s    | V(%) |
|-----------------------|---|-----------|------|------|
| Nach 1. Ausfällung    | 4 | 59,3      | 29,7 | 50   |
| " 2. "                | 3 | 35,7      | 45,3 | 127  |
| " 3. "                | 3 | 48,7      | 35,1 | 72   |
| " 4. "                | 3 | 52,0      | 37,3 | 72   |
| Bei 0,01M u. 0,1M HCl | 4 | 31,0      | 14,3 | 46   |
| Bei 0,001M EDTA       | 2 | 26,5      | 2,1  | 8    |

Tabelle 50: Zinkgehalte in Aktomyosin nach wiederholter Ausfällung

| Nr. und Probe        | Zahl der Fällungen | Sonderbehandlung | Protein % | µg Zn/g Prot. | $\bar{x} \pm s$ |
|----------------------|--------------------|------------------|-----------|---------------|-----------------|
| M.long.cervicis, Rd. |                    |                  | 19,4      | 181           |                 |
| 50                   | 1                  |                  |           | 102           | } 93,5<br>±6,5  |
| 51                   | 2                  |                  |           | 88            |                 |
| 52                   | 3                  |                  |           | 89            |                 |
| 53                   | 4                  |                  |           | 95            |                 |
| M.glutaeobiceps, Rd. |                    |                  | 18,7      | 230           |                 |
| 54                   | 1                  |                  |           | 40            | } 28,3<br>±14,0 |
| 55                   | 2                  |                  |           | 8             |                 |
| 56                   | 3                  |                  |           | 32            |                 |
| 57                   | 4                  |                  |           | 33            |                 |
| Herzmuskel, Rind     |                    |                  | 15,3      | 151           |                 |
| 58                   | 1                  |                  |           | 38            | } 28,6<br>±11,9 |
| 59                   | 2                  |                  |           | 11            |                 |
| 60                   | 3                  |                  |           | 25            |                 |
| 61                   | 4                  |                  |           | 28            |                 |
| 62                   | -                  | 14 Tage bei 4°C  |           | 41            | 41              |
| Herzmuskel, Rind     |                    |                  | 16,3      | 122           |                 |
| 63                   | 1                  | -                |           | 57            | } 36,2<br>±17,0 |
| 64                   | 1                  | 0,01N HCl        |           | 40            |                 |
| 65                   | 1                  | 0,01N HCl        |           | 34            |                 |
| 66                   | 1                  | 0,1N HCl         |           | 40            |                 |
| 67                   | 1                  | 0,1N HCl         |           | 10            |                 |

Der Zinkgehalt von Aktomyosin erfährt durch mehrfache Proteinfällungen keine größeren Veränderungen. Die Mittelwerte der Relation µg Zink/g Protein bewegen sich in Actomyosingelen verschiedener Muskelgewebe zwischen 28,3 und 93,5. Die Zinkkonzentrationen schwanken nach mehrfachem Ausfällen weniger als bei verschiedenen Muskelproben. Daraus könnte eventuell geschlossen werden, daß Actomyosin eine konstante Menge Zn bindet. Auch eine drastische Behandlung mit EDTA und HCl kann, wie die Untersuchungen Nr. 60 - 67 zeigen, daraus Zn nicht entfernen. Ferner beeinflußt eine längere Lagerzeit des Actomyosingels (Nr. 62) nicht seinen Zinkgehalt.

Der Zinkgehalt des Actomyosins ist im Herzmuskel des Rindes geringer als im Skelettmuskel; aber auch der M.glutaeobiceps ergibt zinkarmes Actomyosin. Möglicherweise liegt dies in der unterschiedlichen molekularen Struktur dieser Proteine begründet.

Zur physiologischen Relevanz dieser Zinkbindungsversuche sei eine Anmerkung von HAMM (106) eingefügt. Der Autor kritisiert die Bestimmung von Ionen im Überstand von Homogenaten, weil dabei das Gleichgewicht zwischen elektrostatisch gebundenen und freien Ionen eine beträchtliche Verschiebung erfahre, und sich bei der Abtrennung des Sarkoplasmas der isoelektrische Punkt verändere. Eine geeignete Methode zur Messung solcher Interaktionen böte die Gleichgewichtsdialyse mit radioaktiven Isotopen.

#### 4. Fleischtechnologische Bewertung der Versuche

Die Vielzahl undefinierter Einflußgrößen erschwert die Beurteilung der fleischtechnologischen Rolle des Zinks erheblich. Es seien hier nur die Veränderungen im pH-Wert, die Konzentration anderer Elemente und die nur schwer oder überhaupt nicht standardisierbaren Muskelproben angesprochen.

Trotzdem erlauben die Ergebnisse gewisse Schlüsse. Sie geben zu erkennen, daß dem Zink vermutlich nicht die Wirkung auf die Löslichkeit und Aktivierung myofibrillärer Eiweißkörper und deren Wasserbindungsvermögen zukommen kann, die ihm bisweilen zugemessen worden war. Dafür sprechen mehrere Beobachtungen.

Zink ist, wie die Untersuchungen zeigten, in offensichtlich unterschiedlichen Konzentrationen in allen drei isolierten subzellulären Fraktionen enthalten. Am meisten Zink wurde in der nucleomyofibrillären und vor allem in der wasserlöslichen Fraktion gefunden, am wenigsten in der mitochondrialen.

Ca. 50 - 100 µg Zink/g Protein erwiesen sich als fest an myofibrilläre Eiweißkörper gebunden.

Daß die gefundene intrazelluläre Zinkverteilung nur näherungsweise seiner tatsächlichen Verteilung in der Muskelzelle entsprechen dürfte, ist vor allem aus der Tatsache er-

sichtlich, daß ein Übergang von Zink aus der Kernfraktion durch mehrfaches Ausfällen in die lösliche Fraktion beobachtet wurde.

Zellkern- und myofibrilläre Fraktionen dürften deshalb im Nativmuskel mehr Zink enthalten als im Homogenat.

Bemerkenswert für die Rolle des Zinks scheint auch die Feststellung, daß aus Muskelhomogenaten zinkarmer bzw. zinkreicher Muskeln gleichviel myofibrilläres Eiweiß in Lösung geht. Zink kann demnach für die Mobilisierung fibrillärer Eiweißkörper, insbesondere aber deren Löslichkeit nur von untergeordneter Bedeutung sein.

Die Feststellung wird durch mehrere andere Beobachtungen noch unterstrichen. So wurde bei Erhöhung des pH-Wertes der Homogenate eine verminderte Abgabe des Zinks aus myofibrillärem Eiweiß registriert. Sie dürfte auf die erhöhte Ladungsstärke des Proteins zurückzuführen sein. Eine pH-Wert-Erniedrigung bewirkt den gegenteiligen Effekt, d.h. eine vermehrte Abgabe von Zink infolge einer verringerten Ladungsstärke der Zellkern- und Strukturproteine. Bei pH 5 war z.B. 75 - 90 % des Zinks aus Muskelhomogenat extrahierbar, bei pH 8 dagegen nur 57 - 79 %. Auch hohe Ionenstärken begünstigen eine Abgabe von Zink aus myofibrillären Bindungen (7).

Zinkionen sind im Brät bei der Brühwurstherstellung - der pH bewegt sich im allgemeinen zwischen 5,8 und 6,3, die Ionenstärke durch Salzung zwischen 0,37 und 0,45 - für die Mobilisierung salzlöslicher Muskelproteine nicht gerade förderlich; im Brät herrschen jedenfalls höhere Ionenstärken als im Nativmuskel. Sie begünstigen jedoch eine Abgabe des Zn aus Strukturprotein. Die Zinkverminderung scheint jedoch nicht so ausgeprägt, daß eine erhebliche Strukturauflockerung des myofibrillären Eiweisses durch den Fortfall der vernetzenden Wirkung der Zinkionen erwartet werden dürfte.

Weiter spricht gegen eine beachtliche fleischtechnologische Bedeutung, daß das Zinkenzym LDH - es bestimmt den postmortalen pH-Verlauf - in seiner Aktivität nicht mit dem Zinkgehalt des Sarkoplasmas korreliert ist.

#### D. Zusammenfassung

1. Resorption, Verteilung, Ausscheidung, sowie Mangelsymptome und Toxizität des Zinks wurden besprochen und die Wechselwirkungen des zweiwertigen Kations in der Biochemie des Fleisches gewürdigt. Infolge seiner vernetzenden Wirkung auf Molekülketten vermag es in Geweben Wasser zu verdrängen. Jedoch ist seine Wirkung isoliert nur schwer zu erfassen und von der anderer Minerale zu trennen.
2. Anhand der Literatur über Zellaufbau und Zellkompartimentierung wurde eine unter den gegebenen Bedingungen durchführbare Methode der Zellfraktionierung entwickelt. Sie orientierte sich an der klassischen Vier-Stufen-Fraktionation im Schwerkraftfeld.
3. Die entwickelte atomabsorptionsspektrometrische Zinkbestimmung in der Flamme wurde auf ihre Eignung für die beabsichtigten Untersuchungen von biologischem Material in folgenden Kriterien geprüft: Empfindlichkeit ( $0,04 \text{ ppm} = 0,08 \text{ ug in } 2 \text{ ml}$ ), Nachweisgrenze ( $L_D = 0,069 \text{ ppm}$ ), Bestimmungsgrenze ( $L_Q = 0,21 \text{ ppm}$ ), Genauigkeit ( $V = 6,7 \%$ ; bei Untersuchung von Gewebeproben mit circa  $20 \text{ ug}$  Zink in  $0,4 \text{ g}$ ) und Richtigkeit (recovery bei  $93,3 - 100,4 \%$ ).
4. Schlachtfrisch gewonnene Proben aus verschiedenen Skelettmuskeln von Schwein, Rind und Taube, sowie aus Herzmuskel und Leber von Schwein und Rind, wurden auf Trockensubstanz, Asche, Zink und Rohprotein untersucht. In der Literatur erwähnte Zinkgehalte bestimmter Muskelgruppen konnten im wesentlichen bestätigt werden: Dunkle Muskulatur enthält mehr Zink als helle; der Herzmuskel erweist sich als zinkarm.
5. Die Durchführung der Zellfraktionierung in den untersuchten Geweben erfolgte nach dem klassischen Modell von HOGEBOM (125). Zur Homogenisation wurden verwendet ein Potter-Elvehjem Grinder oder der Waring Blendor, als Medium eine isotone Zuckerlösung oder KCl-Medium. Durch Zentrifugation

wurden Kernfraktion (1), Mitochondrienfraktion (2) und löslicher Überstand (3) erhalten. In jeder Fraktion wurde der Gehalt an Trockensubstanz, Asche, Zink und Protein bestimmt. Das Verhältnis  $\mu\text{g}$  Zink/ g Protein betrug in der Kernfraktion des Lebergewebes vom Schwein 60, des Taubenbrustmuskels 46 - 61, der zinkreichen Skelettmuskeln vom Rind 249, der zinkarmen 124 und des Rinderherzmuskels 123. Die Mitochondrienfraktion enthielt im allgemeinen niedrigere Werte, der lösliche Überstand höhere. In der dunklen Muskulatur des Rindes scheint das vermehrt vorhandene Zink auch an myofibrilläre Proteine gebunden zu sein.

6. In wässrigen Extrakten von Muskelproben wurden Protein und Zink bestimmt. Die Extraktionsausbeuten an Stickstoff in Prozent des Gesamt-N betrugen für Myosin am schlachtwarmen Rindermuskel bei Verwendung von Weber-Edsall-Lösung ( $I = 0,6$ ) 9,6 - 27,8 %, für sarkoplasmatische Proteine 15,6 - 19,1 %. Vom Gesamtzink erwiesen sich in Abhängigkeit von den angewandten Bedingungen 3,8 - 81,6 % als extrahierbar. PH-Erhöhung reduziert die Extrahierbarkeit des Zinks aus den strukturellen Muskelproteinen. Actomyosin enthielt pro Gramm Protein 13 - 140  $\mu\text{g}$  Zink, sarkoplasmatisches Protein 323 - 3889  $\mu\text{g}$  Zink.
7. Die Stabilität der Zinkbindung an myofibrilläre Proteine von Rinder- und Schweinemuskeln wurde bei wiederholtem Ausfällen des Actomyosins erkennbar. Im Skelettmuskel des Rindes beläuft sich die Relation  $\mu\text{g}$  Zink/g Protein auf 28,3 - 93,5; im Herzmuskel des Rindes auf 28,6 - 36,2. Mehrfaches Ausfällen des Proteins mit Aqua dest. oder EDTA ergab keinen signifikant erniedrigten Zinkgehalt.

### Summary

1. A survey is given on resorption, metabolism, excretion, deficiency syndrome, and toxicology of zinc.  
The role of this cation in meat technology consists in its dehydrating activity. The zinc ions are thought to form bridges between the filaments and thus decrease the spaces between them.
2. A method for the isolation of subcellular fractions was developed according to the classical four-step-fractionation-scheme of HOGEBOM (125).
3. Flame absorption spectrophotometry was a suitable method for the determination of zinc in biological materials. Sensitivity was 0,04 ppm (0,08 µg zinc in 2 ml), limit of qualitative detection 0,069 ppm, limit of quantitative detection 0,21 ppm, coefficient of variability 6,7 % (100 µg level), and recovery 93,3 - 100,4 %.
4. The contents of moisture, mineral ash, protein, and zinc were determined in porc, beef and pigeon skeletal muscle, porc and beef heart muscle, and liver, respectively. Dark muscles are high in zinc content, pale muscles as well as heart muscle are low.
5. Subcellular fractions were isolated. The tissues were homogenized in isotone sucrose or KCl solution with the Potter-Elvehjem grinder or the waring blender. The nuclear (1) and the mitochondrial fraction (2) were separated by sedimenting the tissue homogenate at 500g/10 min and 10.000 g/20 min, successively, the last supernatant being designated the microsomal and cytoplasmatic fraction (3). The relation µg zinc/g protein in the nuclear fraction was in porc liver 60, in pigeon breast muscle 46 - 61, beef skeletal high-zinc-muscle 249, low-zinc-muscle 124, and beef heart muscle 123. Mitochondrial fractions showed lower, cytoplasmatic fractions higher zinc contents.

The results appear to indicate that dark coloured beef muscle is involved specifically in the binding of zinc.

6. Protein and zinc content was determined in aqueous extracts of muscle tissue samples. Extractability of Nitrogen, in % of total-N, was in beef muscle after slaughter for L-myosin (0,6 N KCl) 9,6 - 27,8; for globular proteins 15,6 - 19,1.  
3,8 - 81,6 % of the total-zinc were extractible according to the conditions of the experiment.  
Increasing ph-values reduce the extractibility of zinc from structural proteins.
7. The stability of zinc-binding to myofibrillar proteins of beef and porc muscle was established by repeating of the washing of those proteins. Zinc/protein in beef skeletal muscle is 28,3 - 93,5  $\mu\text{g/g}$ , in beef heart muscle 28,6 - 36,2  $\mu\text{g/g}$ . This relation does not decrease, when the protein is washed in water or EDTA.

E. Literaturverzeichnis

1. Aebi, H.  
Einführung in die praktische Biochemie  
Akad. Verlagsgesellschaft, Frankfurt (1965)
2. Albert, A.  
Quantitative studies of the avidity of naturally  
occurring substances for trace metals  
Biochem. J. 54, 646 (1953)
3. Allan, J.E.  
Determination of Zinc in Agricultural Materials by  
Atomic Absorption Spectrophotometry  
Analyst 86, 530 (1961)
4. Allfrey, V.  
The isolation of subcellular components  
In: The Cell, Brachet J., and A.E. Mirksy, eds.,  
Academic Press, New York - London, I, 193 (1959)
5. Anderson, J.W., G.A. Cooper, and W.G. Hoekstra  
The histochemistry of the parakeratotic lesions of swine  
J. Invest. Dermatol. 48, 521 (1967)
6. Anderson, N.G., and H.D. Swanson  
Studies on isolated cell components  
Exptl. Cell Res. 23, 58, 318 (1960)
7. Ando, N., and T. Ohashi  
Some observations on the water-holding capacity of meat  
XIX. Europäischer Kongress der Fleischforschungs-  
institute, Paris (1973)
8. Andrási, A., and I. Fehér  
Measurment of the retention and the excretion of  
incorporated zinc-65  
Health Phys. 13, 915 (1967)
9. Anke, M., A. Hennig, and H.-J. Schneider  
The interrelations between cadmium, zinc, copper and  
iron in metabolism of hens, ruminants and man  
In: s. Mill (1970)
10. Arnold, N., E. Wierbicki, and F.E. Deatherage  
Post mortem changes in the interactions of cations and  
proteins of beef and their relation to sex and  
diethylstilbestrol treatment  
Food Techn. 10, 245 (1956)
11. Aubert, X.  
Les ions alcalino-terreux et le muscle strié  
In: Handbuch der experiment. Pharmakologie, Eichler O.  
und A. Farah, eds., Ergänzungswerk, Bd. XVII/1, 337  
(1965)

12. Azzone, G.F., and E. Carafoli  
Biochemical properties of skeletal muscle mitochondria  
Exptl. Cell Res. 21, 447, 456 (1960)
13. Bach, L.M.N.  
Conversion of red muscle to pale muscle  
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 67, 268 (1948)
14. Bachmann, E., G. Lenaz, J.F. Perdue, N. Orme-Johnson,  
and D.E. Green  
The membrane structure of the mitochondrion, V.  
Inner membrane of beef heart mitochondria  
Arch. Biochem. Biophys. 121, 73 (1967)
15. Bailin, G., and M. Barany  
Studies on actin-actin and actin-myosin interaction  
BBA 140, 208 (1967)
16. Barney, G.H., M.C. Orgebin-Christ, and M.P. Macapinlac  
Genesis of esophageal parakeratosis and histologic changes in the testes of the zinc-deficient rat and their reversal by zinc repletion  
J. Nutr. 95, 526 (1968)
17. Bartholomew, M.E., R. Tupper, and A. Wormall  
The intracellular distribution of zinc-65 in normal and tumour tissues after its injection into mice  
Biochem. J. 71, 15P (1959)
18. Bartholomew, M.E., R. Tupper, and A. Wormall  
Incorporation of zinc-65 in the sub-cellular fractions of mice after the injection of zinc-glycine containing zinc-65  
Biochem. J. 73, 256 (1959)
19. Bate-Smith, E.C., and J.R. Bendall  
Changes in muscle after death  
Brit. Med. Bull. 12, 230 (1956)
20. Beaufay, H., D.S. Bendall, P. Baudhuin, R. Wattiaux, and C. DeDuve  
13 Analysis of mitochondrial fractions from rat liver by density gradient centrifuging  
Biochem. J. 73, 628 (1959)
21. Becker, W.M.  
Effects of zinc deficiency in the rat on the binding of tissue zinc and on the synthesis of DNA, RNA and protein  
Univ. Wisconsin Dissertation Abstr. 28:3154B (1968)
22. Berfenstam, R.  
Studies on blood zinc  
Acta Paediat. 87, Suppl. 41, 33, 50, (1952)
23. Berman, M.D.  
Determination of the proximate and electrolyte content of beef  
Food Techn. 14, 429 (1960)

24. Berman, M.D.  
Factors affecting the water retention of beef  
V. Variation of the zinc containing enzymes  
J. Food Sc. 26, 422 (1961)
25. Berman, M.D., and C.E. Swift  
Meat curing. The action of NaCl on meat electrolyte  
binding  
J. Food Sc. 29, 182 (1964)
26. Berschneider, F. und I. Schwenke  
Mineralstoff- und Spurenelementbestimmung im Schweine-  
haar als diagnostische Möglichkeit bei Fehlernährung  
mit diesen Elementen  
Arch. Exptl. Vet. Med. 23, 247 (1969)
27. Bersin, Th.  
Biochemie der Mineral- und Spurenelemente  
Akad. Verlagsgesellschaft, Frankfurt (1963)
28. Bielka, H.  
Molekulare Biologie der Zelle  
G. Fischer, Stuttgart (1969)
29. Birks, R.I.  
The sarcoplasmic reticulum of twitch fibres in the  
frog sartorius muscle  
In: Muscle, Paul W.M., ed., (1965)
30. Bischoff, E., H. Brauer, and U. Weser  
Zink-Transport in Rattenleber-Zellkerne  
Z. Physiol. Chem. 350, 1171 (1969)
31. Blamberg, D.L., V.B. Blackwood, W.C. Supplee, and C.F. Combs  
Effect of zinc deficiency in hens on hatchability and  
embryonic development  
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 104, 217 (1960)
32. Blum, J.J.  
Interaction between myosin and its substrates  
Arch. Biochem. Biophys. 87, 104 (1960)
33. Bonebrake, R.A., J.T. McCall, G.G. Hunder, and H.F. Polley  
Zinc metabolism in rheumatoid arthritis  
Arthritis Rheumat. 9, 849 (1966)
34. Bowen, W.J., and H.L. Martin  
Analysis of myosin B for magnesium  
Arch. Biochem. Biophys. 87, 70 (1960)
35. Bowen, W.J., and K. Laki  
Relaxation of ATP-induced tension of glycerol-treated  
muscle fibres by polyphosphate  
Arch. Biochem. Biophys. 91, 173 (1960)
36. Bozler, E.  
Binding of calcium and magnesium by the contractile  
elements  
J. Gen. Physiol. 38, 149 (1954)

37. Bradfield, R.B., T. Yee, and J.M. Baertl  
Hair zinc levels of andean indian children during  
protein caloric malnutrition  
*Americ. J. Clin. Nutr.* 22, 1349 (1969)
38. Bresch, C.  
Klassische und molekulare Genetik  
Springer, Berlin - Heidelberg - New York (1965)
39. Brewer, J.M., T.E. Spencer, and R.B. Ashworth  
Zinc effect on physical properties of bovine carbonic  
anhydrase  
*BBA* 168, 359 (1968)
40. Briggs, D.R.  
"Bound" water in colloids  
*J. Phys. Chem.* 36, 367 (1932)
41. Briskey, E.J., W.G. Hoekstra, W. Bray, and R.H. Grummer  
A comparison of certain physical and chemical  
characteristics of eight pork muscles  
*J. Animal Sc.* 19, 214 (1960)
42. Briskey, E.J., and J. Wismer-Pedersen  
Biochemistry of pork muscle structure II. Preliminary  
observations of biopsy samples versus ultimate muscle  
structure  
*J. Food Sc.* 26, 306 (1961)
43. Bryan, G.W.  
Zinc concentrations of fast and slow contracting  
muscles in the lobster  
*Nature* 11, 1043 (1967)
44. Bryd, C.A., and G. Matrone  
Investigations of the chemical basis of zinc-calcium-  
phytate interactions in biological systems  
*Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 119, 347 (1965)
45. Buchanan, P.J., and J.M. Hsu  
Zinc deficiency and DNA synthesis in rat liver  
*Fed. Proc.* 27, 483 (1968)
46. Bull, H.B., and K. Breese  
Protein hydration I. Binding sites  
*Arch. Biochem. Biophys.* 128, 488 (1968)
47. Bunn, C.R., and G. Matrone  
In vivo interactions of cadmium, copper, zinc and  
iron in the rat  
*J. Nutr.* 90, 395 (1966)
48. Butzow, J.J., and G.L. Eichhorn  
Interactions of metal ions with polynucleotides and  
related compounds IV. Degradation of polyribonucleo-  
tides by zinc and other bivalent metal ions  
*Biopolymers* 3, 97 (1965)

49. Campbell, B.J., Yuan-Chuan-Lin, R.V. Davies, and E. Ballew  
The purification and properties of a particulate renal dipeptidase  
BBA 118, 371 (1966)
50. Campen, D. van  
Competition between copper and zinc during absorption  
In: S. Mills (1970)
51. Cann, J.R.  
Effect of ligands and oxidation state upon the reaction of myoglobin and hemoglobin with zinc  
Biochemistry 3, 903 (1964)
52. Cassens, R.G., W.G. Hoekstra, and E.J. Briskey  
Relation of pork muscle quality factors to zinc content and other properties  
Food Techn. 17, 1 (1963)
53. Cassens, R.G., E.J. Briskey, and W.G. Hoekstra  
Variation in zinc content and other properties of various porcine muscles  
J. Sc. Food Agric. 14, 427 (1963)
54. Chappell, J.B., and S.V. Perry  
Biochemical and osmotic properties of skeletal muscle mitochondria  
Nature 173, 1094 (1954)
55. Christensen, H.N.  
The living cell as a metal binding agent  
Fed. Proc. 20, Suppl. 10, 87 (1961)
56. Cohen, S.R., and I.B. Wilson  
Measurement of the zinc dissociation constants of alkaline phosphatase from E. coli by equilibration with zinc ion buffers  
Biochemistry 5, 904 (1966)
57. Cohn, S.H., and E. Gusmano  
Metabolism of zinc-65 in man  
Radiation Res. 24, 432 (1965)
58. Cooke, P.A. und W. Wondzinski  
Atomabsorptionsspektralphotometrie  
Philips Elektronik Industrie GmbH, Hamburg
59. Cope, F.W.  
Nuclear magnetic resonance evidence for complexing of sodium ions in muscle  
Proc. Nat. Acad. Sc. 54, 225 (1965)
60. Corsi, A., and S.V. Perry  
Some observations on the location of myosin, actin and tropomyosin in the rabbit myofibril  
Biochem. J. 68, 12 (1958)
61. Davies, I.J., M. Musa, and T.L. Dormandy  
Measurements of plasma zinc  
J. Clin. Pathol. 21, 359 (1968)

62. Drabikowski, W., and H. Strzelecka-Golaszewska  
The exchange of actin-bound calcium with various bi-valent cations  
BBA 71, 486 (1963)
63. Draper, M.H., and A.J. Hodge  
Electroninduced microincineration with the electron microscope I. Distribution of the residual mineral content in vertebrate striated muscle  
Austral. J. Exptl. Biol. Med. 28, 249 (1950)
64. Dreosti, I.E., S.H. Tao, and L.S. Hurley  
Plasma zinc and leukocyte changes in weanling and pregnant rats during zinc deficiency  
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 128, 169 (1968)
65. Drum, D.H., J.H. Harrison, T.K. Li, J.L. Bethune, and B.L. Vallee  
Structural and functional zinc in horse liver alcohol dehydrogenase  
Proc. Natl. Acad. Sc. 57, 1434 (1967)
66. deDuve, C.  
Origin of mitochondria  
Science 182, 85 (1973)
67. Eder, M.  
Probleme des Zinknachweises am Darm  
Acta Histochem. Suppl. III (1963)
68. Edman, K.A.P.  
Zinc-incuced relaxation of muscle fibre bundles  
Acta Physiol. Scand. 49, 330 (1960)
69. Edsall, J.T., Felsenfeld G., Goodman D.S., and F.R.N. Gurd  
The association of imidazole with the ions of zinc and cupric copper  
Fed. Proc. 11, 224 (1952)
70. Edwards, R.R.C.  
Estimation of the respiratory rate of young plaice *Pleuronectes platessa* L. in natural conditions using zinc-65  
Nature 216, 1335 (1967)
71. Eggleton, W.E.G.  
The zinc and copper contents of the organs and tissues of chinese subjects  
Biochem. J. 34, 991, (1940)
72. Eichhorn, G.L.  
Metal chelate compounds in biological systems  
Fed. Proc. 20, Suppl. 10, 40 (1961)
73. Elbers, R., H.W. Heldt, P. Schmucker, S. Soboll, and H. Wiese  
Measurement of the ATP/ADP ratio in mitochondria and the extramitochondrial compartment by fractionation of freeze-stopped liver tissue in non-aqueous media  
Z. Physiol. Chem. 355, 378 (1974)
74. Engström, A.  
Elementaranalyse mit Röntgenstrahlen  
Acta Histochem. Suppl. III (1963)

75. Ernster, L., D. Ikkos, and R. Luft  
Enzymic activities of human skeletal muscle mitochondria  
a tool in clinical metabolic research  
Nature 184, 1851 (1959)
76. Ernster, L., and K. Nordenbrand  
Skeletal muscle mitochondria  
In: Methods in Enzymology, Estabrook R.W., and M.E. Pull-  
man, eds., New York and London, Vol. 10 (1967)
77. Esipova, N.G., and A. Chirgadze  
Structural role of water in fibrillar proteins and  
polypeptides  
In: Water in biological systems, Kayushin, L.P., ed.,  
Consultants Bureau, New York (1969)
78. Ferm, V.H., and S.J. Carpenter  
Teratogenic effect of cadmium and its inhibition by zinc  
Nature 216, 1123 (1967)
79. Fischer, A.  
Weitere Studien über die Extraktion und Löslichkeit von  
Muskeleiweiß unter Berücksichtigung technologischer  
Gesichtspunkte  
Dissertation, Ludwig-Maximilian-Universität München (1970)
80. Fischer, G.M., E.I. Mata, and J.G. Laurado  
Regional differences in magnesium, calcium and zinc com-  
position of arterial wall in normal and hypertensive dogs  
Americ. Heart J. 75, 784 (1968)
81. Fuchs, F., and F.N. Briggs  
The site of calcium binding in relation to the activation  
of myofibrillar contraction  
J. Gen. Physiol. 51, 655 (1968)
82. Fuhrmann, G.F., and A. Rothstein  
The transport of Zn, Co and Ni into yeast cells  
BBA 163, 325 (1968)
83. Fujioka, M., and Lieberman I.  
Zinc requirement for synthesis of DNA by rat liver  
J. Biol. Chem. 239, 1164 (1964)
84. Furchner, J.E., and C.R. Richmond  
Effect of dietary zinc on the absorption of orally ad-  
ministered zinc-65  
Health Phys. 8, 35 (1962)
85. Fuwa, K.  
Flame Absorption Spectrometry  
In: Spectrochemical methods of analysis, Winefordner J.D.,  
ed., Wiley-Interscience, New York - London (1971)
86. Garcia-Amo, C., E. Iranzo, A. Chueca, and A. Santos-Ruiz  
The change of zinc-65 distribution in the guinea pig  
In: s. Mills (1970)

87. Gosh, B.N., and E. Mihalyi  
Binding of ions by myosin II. The effect of neutral salts on the acid-base-equilibrium of myosin  
Arch. Biochem. 14, 107 (1952)
88. Goutefongea, R.  
Relation entre le teneur en potassium, sodium, calcium et magnésium du muscle de porc et certains caractéristique physicochimiques  
Ann. Zootechn. 17, 207 (1968)
89. Graig, F.A., and E. Siegel  
Distribution in blood and excretion of zinc-65 in man  
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 104, 391 (1960)
90. Grau, R., and R. Hamm, and A. Baumann  
Water-binding capacity of mammalian muscles. The influence of ph-values on the water binding of ground beef muscles  
Biochem. Z. 325, 1 (1953)
91. Greaves, M., and T.R.C. Boyde  
Plasma zinc concentrations in patients with psoriasis, other dermatoses, and venous leg ulceration  
Lancet 2, 1019 (1967)
92. Gunn, S.A., T.C. Gould, S.S. Ginori, and J.G. Morse  
Selective uptake of zinc-65 by dorsolaterale prostate of rat  
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 87, 556 (1955)
93. Haas, J.  
Die Physiologie der Muskelzelle  
Bornträger, Berlin (1963)
94. Haas, J.  
Die Zelle  
Bornträger, Berlin (1961)
95. Hallermayer, G., and W. Neupert  
Lipid composition of mitochondrial outer and inner membranes of Neurospora crassa  
Z. Physiol. Chem. 355, 279 (1974)
96. Hamm, R.  
Fleischmineralien und Fleischqualität. Ca, Mg und Zn und ihre Bedeutung für die Wasserbindung und Farbe des Fleisches  
Fleischwirtschaft 8, 266, 340 (1956)
97. Hamm, R.  
Über das Wasserbindungsvermögen des Säugetiermuskels. III. Mitt.: Die Wirkung von Neutralsalzen  
Z. Lebensm. -Unters. -Forschung 106, 281 (1957)
98. Hamm, R.  
Über die Mineralstoffe des Säugetiermuskels. I. Mitt.: Mg, Ca, Zn und Fe und ihre Bedeutung für die Muskelhydratation. II. Mitt.: Der Bindungszustand von Mg, Ca, Zn, Fe und Phosphat im Muskel post mortem  
Z. Lebensm. -Unters. -Forschung 107, 423 (1958) und 110, 95 (1959)

99. Hamm, R.  
Zur Biochemie der Fleischreifung. II. Mitt.: Proteinladung und Muskelhydratation  
Z. Lebensm. -Unters. -Forschung 10, 227 (1959)
100. Hamm, R.  
Intermolekulare Wechselwirkungen im Muskeleiweiß und ihre Bedeutung für das Wasserbindungsvermögen des Fleisches  
Fleischwirtschaft 14, 958 (1962)
101. Hamm, R.  
Chemische und physikalische Veränderungen beim Erhitzen von Fleisch. I. Mitt.: Einfluß des Erhitzens auf den Bindungszustand von Mg, Ca und Phosphat im Rindermuskel  
Z. Lebensm. -Unters. -Forschung 117, 113 (1962)
102. Hamm, R.  
Zur Biochemie der Fleischreifung. IV. Mitt.: Die postmortale Änderung der Bindung von Mg, Ca, Zn und Fe im Rindermuskel  
Z. Lebensm. -Unters. -Forschung 117, 132 (1962)
103. Hamm, R.  
Über das Wasserbindungsvermögen des Säugetiermuskels. VII. Mitt.: Zur Theorie der Wasserbindung  
Z. Lebensm. -Unters. -Forschung 116, 120 (1962)
104. Hamm, R.  
Über das Wasserbindungsvermögen des Säugetiermuskels. XI. Mitt.: Einfluß des Muskelplasmas und der in ihm enthaltenen Mineralstoffe auf das Wasserbindungsvermögen des Rindermuskels  
Z. Lebensm. -Unters. -Forschung 117, 8 (1962)
105. Hamm, R. und K. Hofmann  
Changes in the sulfhydryl and disulfide groups in beef muscle proteins during heating of meat  
Nature 207, 1269 (1965)
106. Hamm, R.  
Biochemie des Fleisches  
Parey, Berlin - Hamburg (1972)
107. Harman, J.W., and M. Feigelson  
Studies on mitochondria. III. The relationship of structure and function of mitochondria from heart muscle.  
IV. The cytological localization of mitochondria in heart muscle  
Exptl. Cell Res. 3, 47, 58 (1952)
108. Harman, J.W., and U.H. Osborne  
The relationship between cytochondria and myofibrills in pigeon skeletal muscle  
J. Exptl. Med. 98, 81 (1953)
109. Harrison, M.F.  
Effect of starvation on the composition of the liver cell  
Biochem. J. 55, 204 (1953)

110. Harrow, B., and A. Mazur  
Textbook of Biochemistry  
Saunders, Philadelphia - London (1966)
111. Hasselbach, W. und G. Schneider  
Der L-Myosin- und Actingehalt des Kaninchenmuskels  
Biochem. Z. 321, 462 (1951)
112. Hasselbach, W.  
Die Bindung von Adenosindiphosphat, von anorganischem  
Phosphat und von Erdalkalien an die Strukturproteine  
des Muskels  
BBA 25, 265 (1957)
113. Haumont, S.  
Distribution of zinc in bone tissue  
J. Histochem. Cytochem. 9, 141 (1961)
114. Haurowitz, F.  
The Chemistry and Function of Proteins  
Academic Press, New York - London (1963)
115. Hazlewood, C.F., H.L. Nicols, and N.F. Chamberlain  
Evidence for the existence of a minimum of two phases  
of ordered water in skeletal muscle  
Nature 222, 747 (1969)
116. Heath, J.C.  
Zinc in nuclear desoxyribose nucleoprotein  
Nature 164, 1055 (1949)
117. Hecht H., A. Mirna und P. Schramel  
Untersuchungen über den Gehalt an Spurenelementen in  
Schweine-, Rind- und Kalbfleisch  
Fleischwirtschaft Nr. 2, 237 (1973)
118. Hechter, O.  
Role of water structure in the molecular organization  
of cell membranes  
Fed. Proc. 24, Suppl. 15, 91 (1965)
119. Hedman, R.  
Properties of isolated skeletal muscle mitochondria from  
rat  
Exptl. Cell Res. 38, 1 (1965)
120. Henkin, R.I.  
Newer aspects of copper and zinc metabolism  
In: Newer trace elements in nutrition, Mertz, W., and  
W.E. Cornatzer, eds., Marcel Dekker, New York (1971)
121. Herman, G.E., and Kun, E.  
Intracellular distribution of copper in rat liver and  
its response to hypophysectomie and growth hormone  
Exptl. Cell Res. 22, 257 (1961)
122. Heth, D.A., W.M. Becker, and W.G. Hoekstra  
Effect of calcium, phosphorus and zinc on zinc-65 ab-  
sorption and turnover in rats fed semipurified diets  
J. Nutr. 88, 331 (1966)

123. Himmelhoch, S.R., H.A. Sober, B.L. Vallee, E.A. Peterson, and K. Fuwa  
Spectrographic and chromatographic resolutions of metalloproteins in human serum  
Biochemistry 5, 2523 (1966)
124. Hoekstra, W.G.  
Skeletal and skin lesions of zinc-deficient chickens and swine. Possible relationship to "connective tissue diseases" of man  
Amer. J. Clin. Nutr. 22, 1268 (1969)
125. Hogeboom, G.H.  
Cytochemical studies of mammalian tissues. II. The distribution of diphosphopyridine nucleotide - cytochrome c reductase in rat liver fractions  
J. Biol. Chem. 177, 847 (1949)
126. Hollemann, A.F. und E. Wiberg  
Lehrbuch der anorganischen Chemie  
de Gruyter, Berlin (1964)
127. Hotta, K., and S. Kajima  
Interactions between muscle proteins and the zinc ion  
J. Biochem. 55, 486 (1964)
128. Howland, J.L.  
Cell Physiology  
Collier-Macmillan, London - New York (1973)
129. Hsu, J.M., W.L. Anthony and P.J. Buchanan  
Zinc deficiency and the metabolism of labelled cystine in rats  
In: S. Mills (1970)
130. Hsu, J.M., and W.L. Anthony  
Impairment of cysteine - <sup>35</sup>S incorporation into skin protein by zinc deficient rats  
J. Nutr. 101, 445 (1971)
131. Huber, A.M., and S.N. Gershoff  
Effects of dietary zinc and calcium on the tentation and distribution of zinc in rats fed semipurified diets  
J. Nutr. 100, 949 (1970)
132. Hurley, L.S.  
Zinc deficiency in the developing rat  
Amer. J. Clin. Nutr. 22, 1332 (1969)
133. Huxley, H.E.  
Muscle Cells  
In: The Cell, Brachet, J., and A.E. Mirksy, eds., Academic Press, New York - London, IV/1, 365 (1960)
134. International Atomic Energy Agency  
Usis of activation analysis in studies of mineral metabolism in man  
Panel Meeting, Teheran 1968, Pub. IAEA, Wien (1970)
135. Joslyn, M.A.  
Food Science and Technology  
Academic Press, New York - London (1970)

136. Kasai, M.  
The divalent cation bound to actin and thin filament  
BBA 172, 171 (1969)
137. Kaufmann, G.  
Untersuchungen über Aufnahme, Verteilung, Verweildauer  
und Ausscheidung von Zink-65 in Hennen und Hähnen  
Dissertation, Ludwig-Maximilian-Universität München (1972)
138. Keilin, D., and T. Mann  
Carbonic anhydrase. Purification and nature of the enzyme  
Biochem. J. 34, 1163 (1940)
139. Kerp, L.  
Bedeutung von Zink für die Histaminspeicherung in Mast-  
zellen  
Int. Arch. Allergy Appl. Immunology 22, 112 (1963)
140. Kerr, W.K., A.G. Keresteci, and H. Mayok  
The distribution of zinc within the human prostate  
Cancer 13, 550 (1960)
141. Khan, A.W.  
Extraction and fractionation of proteins in fresh  
chicken muscle  
J. Food Sc. 27, 430 (1962)
142. Khan, M.M., and A.E. Martell  
Metal chelates of adenosinediphosphoric and adenosine-  
monophosphoric acid  
J. Americ. Chem. Soc. 84, 3037 (1962)
143. Kielley, W.W., and L.B. Bradley  
The relationship between sulfhydrylgroups and the  
activation of myosin adenosinetriphosphate  
J. Biol. Chem. 218, 653 (1956)
144. Kienholz, E.W., D.E. Turk, M.L. Sunde, and W.G. Hoekstra  
Effects of zinc deficiency in the diets of hens  
J. Nutr. 75, 211 (1961)
145. Kirchgeßner, M., W. Munz und W. Oelschläger  
Der Einfluß einer  $\text{CaCO}_3$ -Zulage auf die Retention von  
Mengen- und Spurenelementen bei wachsenden Schweinen  
Arch. Tierernährung 10, 1 (1960)
146. Kirchgeßner, M.  
Tierernährung  
DLG-Verlag, Frankfurt (1970)
147. Kirchgeßner, M. und Dora A. Roth-Maier  
Zur Retention von Mengenelementen (Ca, P, Mg, Na, K) und  
Spurenelementen (Fe, Cu, Mn, Zn) von Mastkücken  
Zbl. Vet. Med. A 19, 111 (1972)
148. Kirsch, J.F.  
Mechanism of enzyme action  
Ann. Rev. Biochem. 42, 205 (1973)
149. Kitiyakara, A., and J.W. Harman  
The cytological distribution in pigeon skeletal muscle  
of enzymes acting on phosphorylated nucleotides  
J. Exptl. Med. 97, 553 (1953)

150. Klement, J.T., R.G. Cassens, and O.R. Fennema  
The association of protein solubility with physical properties in a fermented sausage  
XIX. Europäische Tagung der Fleischforschungsinstitute, Paris (1973)
151. Klingenberg, M. und P. Schollmeyer  
Zur Reversibilität der oxydativen Phosphorylierung  
Biochem. Z. 333, 335 (1960)
152. Klotz, I.M., and W.-C. Loh Ming  
Mediation by metals of the binding of small molecules by proteins  
J. Americ. Chem. Soc. 76, 805 (1954)
153. Klotz, I.M.  
Protein hydration and behaviour  
Science 128, 815 (1958)
154. Kmet, J.  
Selected aspects of trace elements in cancer research  
In: s. Int. Atomic Energy Agency (1970)
155. Koch, O.G. und G.A. Koch-Dedic  
Handbuch der Spurenanalyse  
Springer, Berlin - Hamburg - New York (1974)
156. Komai, H., and J.B. Neilands  
Effect of the zinc ion on porphyrin synthesis in *Ustilago sphaerogena*  
Fed. Proc. 26, 673 (1967)
157. Kotter, L.  
Zur Wirkung kondensierter Phosphate und anderer Salze auf tierisches Eiweiß  
Schaper, Hannover (1960)
158. Krölling, O. und H. Grau  
Lehrbuch der Histologie und vergleichenden mikroskopischen Anatomie der Haustiere  
Parey, Berlin - Hamburg (1960)
159. Kronman, M.J., L.E. Weinberger, and R.J. Winterbottom  
The water-soluble proteins of bovine skeletal muscle  
Arch. Biochem. Biophys. 86, 238 (1960)
160. Ku, P.K., D.E. Ullrey, and E.R. Miller  
Zinc deficiency and tissue nucleic acid and protein concentration  
In: s. Mills (1970)
161. Kulmbacher Vortragstagung  
Probleme der Fleischforschung aus der Sicht der Cytochemie  
Kulmbach (1965)
162. Kuschinsky, G. und F. Turba  
Über die Rolle der SH-Gruppen bei den Vorgängen am Aktomyosin, Myosin und Aktin  
BBA 6, 426 (1951)

163. Lawrie, R.A.  
Some observations on factors affecting myoglobin concentrations in muscle  
J. Agric. Sc. 40, 356 (1956)
164. Lawrie, R.A., D.P. Gatherum, and H.P. Hale  
Abnormally low ultimate pH in pig muscle  
Nature 182, 807 (1958)
165. Lawrie, R.A.  
Meat Science  
Pergamon Press, Oxford - London (1966)
166. Leeuwen, J.M. van, and J. van der Grift  
Observations on the zinc metabolism of calves  
In: s. Mills (1970)
167. Legg, S.P., and L. Sears  
Zinc sulphate treatment of parakeratosis in cattle  
Nature 4730, 1061 (1960)
168. Lehninger, A.L.  
The Mitochondrion  
Benjamin, New York (1964)
169. Leibetseder J.  
Über den Zinkstoffwechsel beim Schwein  
Landwirtschaftlich-chemische Versuchsanstalt, Wien  
Forschungstagung (1970)
170. Levine, C., and C. Chargaff  
Phosphatide composition in different liver cell fractions  
Exptl. Cell Res. 3, 145 (1952)
171. Lewis, P.K., W.G. Hoekstra Jr., R.H. Grummer, and P.H. Phillips  
The effect of certain nutritional factors, including calcium, phosphorous and zinc on parakeratosis in swine  
J. Animal Sc. 15, 741 (1956)
172. Lockett, C., C.E. Swift, and W.L. Sulzbacher  
Some relations between the chemical and physical characteristics of bovine muscles  
J. Food Sc. 27, 36 (1962)
173. Lorenz, B., W. Kleinow, and H. Weiss  
Mitochondrial translation of cytochrome b in *Neurospora crassa* and *Locusta migratoria*  
Z. Physiol. Chem. 355, 300 (1974)
174. Luecke, R.W., B.E. Ruksan, and B.V. Baltzer  
The zinc content of blood serum and bone as indices of dietary zinc adequacy in the rat  
In: s. Mills (1970)
175. Macapinlac, M.P., W.N. Pearson, G.H. Barney, and W.J. Darby  
Protein and nucleic acid metabolism in the testes of zinc-deficient rats  
J. Nutr. 95, 569 (1968)

176. Mahler, H.R., and E.H. Cordes  
Biological Chemistry  
Harper & Row, London (1971)
177. Marshall, G.B., and Smith, A.C.  
The determination of zinc in the feed water of high pressure boilers by atomic-fluorescence spectroscopy  
Analyst 97, 447 (1972)
178. Martin, R.B.  
Metal ion binding to peptides and proteins  
Fed. Proc. 20, Suppl. 10, 54 (1961)
179. Martonosi, A., C.M. Moliho, and J. Gergely  
The binding of divalent cations to actin  
J. Biol. Chem. 239, 1057 (1964)
180. Martonosi, A.  
The sulfhydryl groups of actin  
Arch. Biochem. Biophys. 123, 29 (1968)
181. Masironi, L.  
Trace elements in cardiovascular diseases  
In: s. Int. Atomic Energy Agency (1970)
182. Maske, H.  
Beobachtungen über das Zink in den Langerhans'schen Inseln des Pankreas und seine Beziehungen zur Inseln-funktion  
Z. Naturforschung 8b, 96 (1953)
183. Maugh, T.H.  
Trace elements: a growing appreciation of their effects on man  
Science 181, 253 (1973)
184. Mawson, C.A., and M.I. Fischer  
Zinc and carbonic anhydrase in human serum  
Biochem. J. 55, 696 (1953)
185. McClain, P.E., and A.M. Mullius  
Relationship of water binding and pH to tenderness of bovine muscles  
J. Animal Sc. 29, 286 (1969)
186. McIntosh, E.N.  
Post-mortem changes in protein extractability in beef, pork and chicken muscle  
J. Food Sc. 32, 208 (1967)
187. McKenney, J.R., R.O. McClellan, and L.K. Bustad  
Early uptake and dosimetry of zinc-65 in sheep  
Health Phys. 8, 411 (1962)
188. McLardy  
Zinc enzymes in the hippocampal mossy fibre system  
Nature 194, 300 (1962)
189. Mellon, E.F., A.H. Korn, and S.R. Hoover  
Water absorption of proteins. III. Contribution of the peptide group  
J. Americ. Chem. Soc. 70, 3040 (1948)

190. Mendiola, L.R., and C.A. Price  
Early events in the stimulation by zinc of cytochrome c  
synthesis in *Ustilago*  
*Americ. J. Clin. Nutr.* 22, 1264 (1969)
191. Metzner, H.  
Die Zelle, Struktur und Funktion  
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart (1966)
192. Millar, M.J., N.R. Vincent, and C.A. Mawson  
An autoradiographic study of the distribution of zinc-65  
in rat tissues  
*J. Histochem. Cytochem.* 9, 111 (1961)
193. Miller, J.K., and R.G. Cragle  
Gastrointestinal sites of absorption and endogenous  
secretion of zinc in dairy cattle  
*J. Dairy Sc.* 48, 370 (1965)
194. Miller, W.J., and Miller, J.K.  
Zinc content of certain feeds, associated materials and  
water  
*J. Dairy Sc.* 46, 581 (1963)
195. Miller, W.J., D.M. Blackmon, R.P. Gentry, G.W. Powell,  
and H.F. Perkins  
Influence of zinc deficiency per se on zinc and dry matter  
content of ruminant tissues and on excretion of zinc  
*J. Dairy Sc.* 49, 1446 (1966)
196. Miller, W.J., D.M. Blackmon, J.M. Thiers, R.P. Fowler,  
and C.M. Clifton, and R.P. Gentry  
Effects of adding two forms of supplemental zinc to a  
practical diet on skin regeneration in holstein heifers  
and evaluation of a procedure for determining rate of  
sound healing  
*J. Dairy Sc.* 50, 715 (1967)
197. Miller, W.J., D.M. Blackmon, R.P. Gentry, W.J. Pitts,  
and G.W. Powell  
Absorption, excretion, and retention of orally admini-  
stered zinc-65 in various tissues of zinc-deficient and  
normal goats and calves  
*J. Nutr.* 92, 71 (1967)
198. Miller, W.J., G.W. Powell, D.M. Blackmon, and R.P. Gentry  
Zinc and dry matter content of tissues and feces of zinc-  
deficient and normal ruminants fed EDTA and Cadmium  
*J. Dairy Sc.* 52, 82 (1968)
199. Miller, W.J.  
Absorption, tissue distribution, endogenous excretion,  
and homeostatic control of zinc in ruminants  
*Americ. J. Clin. Nutr.* 22, 1323 (1969)
200. Miller, W.J., D.M. Blackmon, R.P. Gentry, and F.M. Pate  
Effects of high but nontoxic levels of zinc in practi-  
cal diets on zinc-65 and zinc metabolism in holstein  
calves  
*J. Nutrition* 100, 893 (1970)

201. Mills, C.F., J. Quarterman, J.K. Chesters, R.B. Williams, and A.C. Dalgarno  
Metabolic role of zinc  
*Americ. J. Clin. Nutr.* 22, 1240 (1969)
202. Mills, C.F. (ed.)  
Trace element metabolism in animals  
*Proc. WAAP/IBP Int. Symp.*, Aberdeen 1969  
Livingstone, Edinburgh - London (1970)
203. Möhler, K. und F. Kiermeier  
Die Wirkung anorganischer Phosphate auf tierisches Eiweiß. II. Mitt.: Der Einfluß auf die Quellung von Fleischeiweiß  
*Z. Lebensm. -Unters. -Forschung* 96, 90 (1953)
204. Moralis, R., M. Blackstein, and G. Lamirande  
Partial purification and some properties of a 5'RNase from rat liver mitochondrial fraction  
*Arch. Biochem. Biophys.* 121, 711 (1967)
205. Mühlrad, A., N.A. Biro, and K. Vertes  
On the binding of calcium and magnesium to functional structural proteins from muscle  
*Acta Physiol. Acad. Sc. Hung.* 21, 15 (1962)
206. Nagata, K., A. Mitsui, and K. Tsushima  
Intracellular localization of inosine-5'-phosphate dehydrogenase in chicken liver  
*BBA* 177, 680 (1969)
207. Nanninga, L.B.  
Binding of magnesium, calcium and chlorine ions by H-meromyosin and L-meromyosin  
*Arch. Biochem. Biophys.* 70, 346 (1957)
208. Nemethy, G., I.Z. Steinberg, and H.A. Scharega  
Influence of water structure and hydrophobic interactions on the strength of side-chain hydrogen bonds  
*Biopolymers* 1, 43 (1963)
209. Nemetschek, Th. und H. Gansler  
Quellung von Kollagen: Reaktionen mit anorganischen und organischen Ionen  
*Z. Naturforschung* 16, 496 (1961)
210. Neseni, R.  
Mineral-, Wirk- und Fremdstoffe der Milch  
*Inst. Landwirtschaftl. Inf. Dokument.*, Berlin (1964)
211. Netter, H.  
Theoretische Biochemie  
Springer, Berlin - Göttingen - Heidelberg (1959)
212. Nielsen, F.H., M.L. Sunde, and W.G. Hoekstra  
Alleviation of the leg abnormality in zinc-deficient chicks by histamine and by various antiarthritic agents  
*J. Nutrition* 94, 527 (1968)

213. Novikoff, A.B.  
Mitochondria (Chondriosomes)  
In: The Cell, Brachet, J., and A.E. Mirksy, eds.,  
Academic Press, New York - London, Vol. II, 299 (1961)
214. Oberleas, D., and A.S. Prasad  
Growth as affected by zinc and protein nutrition  
Americ. J. Nutr. 22, 1304 (1969)
215. O'Dell, B.L.  
Effect of dietary components upon zinc availability.  
A review with original data  
Americ. J. Clin. Nutr. 22, 1315 (1969)
216. Olson, K.B., G. Heggen, C.F. Edwards, and L.W. Gorham  
Trace element content of cancerous and non-cancerous  
liver tissue  
Science 119, 772 (1954)
217. Ono, K.  
Lysosomal-type enzymes in beef longissimus dorsi muscle  
J. Food Sc. 35, 256 (1970)
218. Ottolenghi, A.C.  
Phospholipase C from *Bacillus cereus*, a zinc requiring  
metalloenzyme  
BBA 106, 510 (1965)
219. Pallauf, J. und M. Kirchgeßner  
Konzentration und Verteilung des Zinks im Organismus.  
1. Mitt. zum Stoffwechsel des Zinks im tierischen Organismus  
Z. Tierphysiol. Tierernähr. Futtermittelkde. 28, 121 (71)
220. Pallauf, J. und M. Kirchgeßner  
Zinkkonzentration im Blut und Serum wachsender Ratten  
bei Zinkmangel  
Zbl. Vet. Med. A 19, 594 (1972)
221. Pallauf, J. und M. Kirchgeßner  
Zinkkonzentration des Rattenhaares bei Zink-Depletion  
und -Repletion. Zur Eignung des Haares als Indikator  
für die Zinkversorgung  
Zbl. Vet. Med. A 20, 100 (1973)
222. Parisi, A.F., and B.L. Vallee  
Zinc metalloenzymes: characteristics and significance  
in biology and medicine  
Americ. J. Clin. Nutr. 22, 1222 (1969)
223. Parrish, F.C.Jr., and M.E. Bailey  
Physicochemical properties of bovine muscle particulate  
cathepsin  
J. Agric. Food Chem. 15, 88 (1967)
224. Pauling, L.  
The adsorption of water by proteins  
J. Americ. Chem. Soc. 67, 555 (1945)
225. Pearson, D.  
The Chemical Analysis of Foods  
Churchill, London (1970)

226. Peenen, H.J., and A. Patel  
Tissue zinc and calcium in chronic disease  
Arch. Pathol. 77, 61 (1964)
227. Perkins, D.J.  
A study of some simple peptide complexes with zinc and cadmium ions in aqueous solution  
Biochem. J. 57, 702 (1954)
228. Perry, H.M.Jr., and H.A. Schroeder  
Lesions resembling vitamin B complex deficiency and urinary loss of zinc procuced by EDTA  
Americ. J. Med. 22, 168 (1957)
229. Perry, S.V.  
The components of the myofibril and their relation to the structure and function  
Symp. Soc. Exptl. Biol. 9, 203. (1955)
230. Persigehl, M., A. Hock, K. Kasperek, E. Land und L.E. Feinendegen  
Änderungen der Zinkkonzentration im Serum bei verschiedenen Stoffwechselsituationen  
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 12, 171 (1974)
231. Pfeleiderer, G., D. Jeckel und T.H. Wieland  
Über den Wirkungsmechanismus der Milchsäure-Dehydrogenase II. Zur Frage des Zinkgehaltés und der SH-Gruppen  
Biochem. Z. 330, 296 (1958)
232. Phillips, J.N.  
Some aspects of metal incorporation into porphyrines  
Enzymology 32, 13 (1967)
233. Piotrowski, J.K., Wanda Bolonowska, and A. Sapota  
Evaluation of metallothioneine content in animal tissues  
Acta Biochem. Pol. 20, 207 (1973)
234. Piper, K.G., and G. Higgins  
Estimation of trace metals in biological materials by atomic absorption spectrophotometry  
Proc. Ass. Clin. Biochem. 4, 190, 196 (1967)
235. Pories, W.J., and W.H. Strain  
The functional role of zinc in epidermal tissue  
In: s. Mills (1970)
236. Porter, H.  
Neonatal mitochondriocuprein: the nature, submitochondrial localization, and possible function of the copper accumulating physiologically in the liver of newborn animals  
In: s. Mills (1970)
237. Potter, V.R., E.F. Bariel, M. Watanabe, and E. Whittle  
Systematic oscillations in metabolic functions in liver from rats adepted to controlled feeding schedules  
Fed. Proc. 27, 1238 (1968)
238. Prasad, A.S.  
A century of research on the metabolic role of zinc  
Americ. J. Clin. Nutr. 82, 1215 (1969)

239. Pulido, P., H.R. Kägi, and B.L. Vallee  
Isolation and some properties of human metallothionein  
*Biochemistry* 5, 1768 (1966)
240. Quadbeck, G.  
Zinkstoffwechsel und Arteriosklerose  
*Acta gerontol.* 3, 151 (1973)
241. Quateman, J.  
A role for zinc and chromium in the insulin stimulation  
of glucose uptake by adipose tissue  
*Biochem. J.* 102, 41P (1967)
242. Quateman, J., W.R. Humphries, and E. Florenze  
Changes in appetite and alimentary muco-substances in  
zinc deficiency  
In: s. Mills (1970)
243. Racoveanu, R., V. Stanulescu, and G. Stoica  
Zinc-65 and Fe-59-binding proteins in guinea pig serum  
In: Radioecological concentration processes, *Proc. Int.  
Symp.*, Stockholm 1966, Aberg, B., and F.P. Hungate, eds.  
Pergamon Press (1967)
244. Ragab, M.H., B. Brightwell, and A.L. Tappel  
Hydrolysis of flavin-adenin-dinucleotide by rat liver  
lysosomes  
*Arch. Biochem. Biophys* 123, 179 (1968)
245. Raskovic, D. and M.A. Gerebtzoff  
Cytochemical localization of zinc in blood- and bone-  
marrow-cells  
*Acta Histochem. Suppl.* III (1963)
246. Reilley, Ch.N.  
Methods of detecting and controlling metal ion levels  
*Fed. Proc.* 20, Suppl. 10, 22 (1961)
247. Reinhold, J.G.  
Effects of trace element deficiencies with special re-  
ference to zinc  
In: s. Int. Atomic Energy Agency (1970)
248. Riedel, L.  
Zum Problem des gebundenen Wassers in Fleisch  
*Kältetechnik* 13, 122 (1961)
249. Robertis, D.P.de  
Cell Biology  
London (1965)
250. Roman, W.  
Zinc in porphyria  
*Americ. J. Clin. Nutr.* 22, 1290 (1969)
251. Rome, E.  
X-ray diffraction studies of the filament lattice of  
striated muscle in various bathing media  
*J. Mol. Biol.* 37, 331 (1968)
252. Rosenberger, G.  
Krankheiten des Rindes  
Parey, Hamburg - Berlin (1970)

253. Rowett Research Institute  
Polynucleotide and protein synthesis in zinc deficiency  
Rowett Res. Inst. Ann. Rep. 23, 99 (1967)
254. Saltman, P., and H. Boroughs  
The accumulation of zinc by fish liver slices  
Arch. Biochem. Biophys. 86, 169 (1960)
255. Sandstead, H.H., A.S. Shukry, A.S. Prasad, M.K. Gabr,  
and A. ElHilfney, N. Mokhtar, and W.J. Darby  
Kwashiorkor in Egypt. I. Clinical and biochemical studies  
with special reference to plasma zinc and lactic  
dehydrogenase  
Americ. J. Clin. Nutr. 17, 15 (1965)
256. Saris, N.E.  
Studies on active calcium transport in mitochondria  
Acta Chem. Scand. 17, 882 (1963)
257. Sarkar, N.K.  
The effect of ions and ATP on myosin and actomyosin  
Enzymologia 14, 237, 242 (1950)
258. Sayre, R.N., and E.J. Briskey  
Protein solubility as influenced by physiological con-  
ditions in the muscle  
J. Food Sc. 28, 675 (1963)
259. Scaife, J.F.  
Variation of ultimate pH within pig muscles  
J. Sc. Food Agric. 6, 467 (1955)
260. Scatchard, G.  
The attractions of proteins for small molecules and ions  
Ann. N.Y. Acad. Sc. 51, 660 (1949)
261. Scharrer, K.  
Biochemie der Spurenelemente  
Parey, Berlin - Hamburg (1955)
262. Schellner, G.  
Die Natrium-, Zink- und Manganversorgung der Milchkühe  
auf Verwitterungsböden verschiedener geologischer Her-  
kunft, gemessen am schwarzen Rinderdeckhaar und  
Acker- und Wiesenrotklee  
Monatshefte Vet. Med. 26, 249 (1971)
263. Schmidt, W.  
Bestimmung von Zink in Lebensmittelaschen mit Hilfe der  
Atomabsorption  
Beckman Applikationsbericht Nr. 1647 (1967) und Nr.  
1769 (1968)
264. Schneider, E., and C.A. Price  
Decreased RNA-levels: possible cause of growth inhibition  
in zinc deficiency  
BBA 55, 406 (1962)
265. Schroeder, H.A., and J. Buckman  
Cadmium hypertension. Its reversal in rats by a zinc  
chelate  
Arch. Environmental Health 14, 693 (1967)

266. Schütte, E.  
Mineralstoffe im Stoffwechsel und als Bausteine im Organismus  
Acta Histochem. Suppl. III (1963)
267. Schütte, K.H.  
Biologie der Spurenelemente  
Bayrischer Landwirtschaftsverlag, München (1965)
268. Schweizer, E.  
Übereinheiten bei Enzymen (Multienzymkomplexe)  
In: Molekularbiologie, Wieland, Th. und G. Pfeleiderer, eds., Umschauverlag, Frankfurt (1967)
269. Scott, G.H.  
Distribution of mineral ash in striated muscle cells  
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 29, 349 (1932)
270. Shin, Y.A., and G.L. Eichhorn  
Interactions of metal ions with polynucleotides and related compounds. XI. The reversible unwinding and re-winding of DNA by zinc ions through temperature manipulation  
Biochemistry 7, 1026 (1968)
271. Siebert, G.  
Biochemische Leistungen des Zellkerns  
In: Molekularbiologie, Wieland, Th. und G. Pfeleiderer, eds., Umschauverlag, Frankfurt (1967)
272. Siebert, G.  
Subzelluläre Strukturen und ihre biologischen Funktionen  
In: s.o.
273. Slater, E.C.  
Biochemistry of sarcosomes  
In: Structure and Function of Muscle, Bourne, G.H., ed., Academic Press, New York - London, II, 105 (1960)
274. Smith, J.C.Jr., E.G. McDaniel, F.F. Fau, and J.A. Halsted  
Zinc: a trace element essential in vitamin A metabolism  
Science 81, 954 (1973)
275. Snellman, O.  
A peptide material from myosin containing sulfhydryl groups  
Acta Chem. Scand. 12, 503 (1958)
276. Spencer, H., and J. Samachson  
Studies on zinc metabolism in man  
In: s. Mills (1970)
277. Sponsler, O.L., J.D. Bath, and J.W. Ellis  
Water bound to gelatin as shown by molecular structure studies  
J. Phys. Chem. 44, 996 (1940)
278. Stagni, N., and B. de Bernard  
Lysosomal enzyme activity in rat and beef skeletal muscle  
BBA 170, 129 (1968)

279. Stauber, W.T., and J.W.C. Bird  
Zonal fractionation studies in rat skeletal muscle  
lysosome-rich fractions  
BBA 338, 234 (1974)
280. Strain, W.H., F. Huegin, C.A. Lankan Jr., W.P. Berliner,  
R.K. McEnvoi, and W.J. Pories  
Zinc-65 retention by aortic tissue of rats  
Int. J. Appl. Rad. Isotopes 15, 231 (1964)
281. Straub, F.B.  
Biochemie  
Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig (1963)
282. Strehlow, C.D., and Th.J. Kneip  
The distribution of lead and zinc in a human skeleton  
Ann. Meeting Americ. Ind. Hyg. Ass. (1968)
283. Sulzbacher, W.L., R.J. Gibbs, C.E. Swift, and A.J. Fryar  
Protein investigation at the USDA Beltsville Meat  
Laboratory  
Proc. 12th Res. Conf. Americ. Meat Ind., 61 (1961)
284. Swenerton, H., R. Shrader, and L.S. Hurley  
Zinc-deficient embryos: reduced thymidine incorporation  
Science 166, 1014 (1969)
285. Swenerton, H., and L.S. Hurley  
Teratogenic effect of a chelating agent and their pre-  
vention by zinc  
Science 173, 62 (1971)
286. Swift, C.E., and M.D. Berman  
Factors affecting the water retention of beef. I.  
Variation in composition and properties of eight muscles  
Food Techn. 13, 365 (1959)
287. Swift, C.E., M.D. Berman, and C. Lockett  
Factors affecting the water retention of beef. II.  
Variation in some pH determinants among eight muscles  
Food Techn. 14, 74 (1960)
288. Szent-Györgyi, A.G.  
Chemistry of muscular contraction  
Academic Press, New York (1951)
289. Szent-Györgyi, A.G.  
Proteins of the Myofibril  
In: The Structure and Function of Muscle, Bourne, G.H.,  
ed., Academic Press, New York - London (1960)
290. Takeuchi, T., M. Suzuki, and M. Yanagisawa  
Some observations on the determination of metals by atom-  
ic absorption spectroscopy combined with extraction  
Anal. Chim. Acta 36, 258 (1966)
291. Tal, M.  
On the role of  $Zn^{2+}$  and  $Ni^{2+}$  in ribosome structure  
BBA 169, 564 (1968)

292. Thiele, H.  
Prinzip einer Strukturbildung  
Naturwissensch. 54, 136 (1967)
293. Thiers, R.E., and B.L. Vallee  
Distribution of metals in subcellular fractions of rat liver  
J. Biol. Chem. 226, 911 (1957)
294. Timm, F.  
Histochemische Lokalisation und Nachweis der Schwermetalle  
Acta Histochemica Suppl. III (1963)
295. Tipton, I.H., M.J. Cook, R.L. Steiner, C.A. Boye, H.M. Perry, and H.A. Schroeder  
Trace elements in human tissue. I. Methods  
Health Phys. 9, 89 (1963)  
II. Adult subjects from the US  
Health Phys. 9, 103, (1963)  
III. Subjects from Africa, the near and far east, and Europe  
Health Phys. 11, 403 (1965)
296. Tipton, I.H.  
Trace elements in human tissues - normal values  
In: s. Int. Atomic Energy Agency (1970)
297. Tolle, A., W. Heeschen, A. Blüthgen, J. Hamann und J. Reichmuth  
Rückstände von Bioziden und Umweltchemikalien in der Milch  
Inst. Hyg. Bundesanstalt f. Milchforsch., Kiel (1973)
298. Tonomura, Y., S. Tokura, and K. Sekiya  
Binding of Myosin A to F-Actin  
J. Biol. Chem. 237, 1074 (1962)
299. Trautman, J.C.  
Effect of temperature and pH on the soluble proteins of ham  
J. Food Sc. 31, 409 (1966)
300. Trethewie, E.R.  
Inhibition of histamine response by zinc  
Pharmacology 1, 195 (1968)
301. Tsao, T.C.  
The localization of proteins in the myofibril. II. Demonstration of the existence of troponin and actin in the thin filaments of striated muscle by direct isolation  
Ref. Chem. Abstr. 64, 13000 (1966)
302. Tupper, R., R.W.E. Watts, and A. Wormald  
The incorporation of zinc-65 into avian eggs  
Biochem. J. 57, 245 (1954)
303. Tupper, R., R.W.E. Watts, and A. Wormald  
The incorporation of zinc-65 in mammary tumours and some other tissues of mice after injection of the isotope  
Biochem. J. 39, 264 (1955)

304. Underwood, E.J.  
Mineral Metabolism  
Ann. Rev. Biochem. 28, 499 (1959)
305. Underwood, E.J.  
Trace elements in human and animal nutrition  
Academic Press, New York - London (1962)
306. Valle, B.L., and J.G. Gibson  
An improved dithizone method for the determination of  
small quantities of zinc in blood and tissue samples  
J. Biol. Chem. 167, 435 (1948)
307. Vallee, B.L., and H. Neurath  
Carboxypeptidase, a zinc metalloprotein  
J. Americ. Chem. Soc. 76, 5006 (1954)
308. Vallee, B.L.  
Zinc and Metalloenzymes  
Advanc. Prot. Chem. 10, 317 (1955)
309. Vallee, B.L., S.J. Adelstein, and J.A. Olson  
Glutamic dehydrogenase of beef liver, a zinc metallo-  
enzyme  
J. Americ. Chem. Soc. 77, 5196 (1955)
310. Vallee, B.L., and F.L. Hoch  
Yeast alcohol dehydrogenase, a zinc metalloenzyme  
J. Americ. Chem. Soc. 77, 821 (1955)
311. Vallee, B.L., and W.E.C. Wacker  
Zinc, a compound of rabbit muscle lactic dehydrogenase  
J. Americ. Chem. Soc. 78, 1771 (1956)
312. Vallee, B.L.  
Biochemistry, physiology and pathology of zinc  
Physiol. Rev. 39, 443 (1959)
313. Vallee, B.L.  
The "active catalytic site", an approach to metallo-  
enzymes  
Fed. Proc. 20, Suppl. 10, 71 (1961)
314. Vallee, B.L.  
Mineral Metabolism  
In: Mineral Metabolism, Comar, C.L., and F. Bronner,  
eds., Academic Press, New York - London, Vol. II/B (1962)
315. Vandenheuvel, F.A.  
Structural role of water in lipoprotein systems  
Protoplasma 63, 188 (1967)
316. VanWazer, J., and C.F. Challis  
Metal complexing by phosphates  
Chem. Rev. 58, 1011 (1958)
317. Voigt, G.E.  
Histochemische Untersuchungen über das Zink im mensch-  
lichen Pankreas beim Diabetes mellitus  
Acta Path. Microbiol. Scand. 41, 381 (1957)

318. Wacker, W.E.C., and B.L. Vallee  
Nucleic acids and metals  
J. Biol. Chem. 234, 3257 (1959)
319. Wacker, W.E.C.  
Nucleic acids and metals. III. Changes in nucleic acid,  
protein and metal content as a consequence of zinc de-  
ficiency in *Euglena gracilis*  
Biochemistry 1, 859 (1962)
320. Wallenfels, K.  
Zinkkomplexe  
Angewandte Chemie 67, 787 (1955)
321. Watson, C.J., and S. Schwartz  
The excretion of zinc uroporphyrin in idiopathic  
porphyria  
J. Clin. Invest. 20, 440 (1941)
322. Weber, H.H.  
Muskelproteine  
BBA 4, 12 (1950)
323. Weiss, Gertrud  
Spurenelemente als Lebenselixier  
Süddeutsche Zeitung Nr. 207, S. 110 vom 8.9.1973
324. Weitzel, G.  
Chemie und Physiologie biogener Zinkverbindungen  
Angewandte Chemie 68, 566 (1956)
325. Weitzel, G., und A.M. Fretzdorff  
Zink-Imidazol-Verbindungen  
Z. Physiol. Chem. 305, 1 (1956)
326. Weitzel, G., F. Schneider und A.M. Fretzdorff  
Zinkkomplexe von Histidylpeptiden  
Z. Physiol. Chem. 307, 18, 23 (1957)
327. Weitzel, G. und Th. Spehr  
Zinkkomplexe von Purinen, Nukleotiden und Nukleosiden  
Z. Physiol. Chem. 313, 212 (1958)
328. Weser, U.  
Reaction of some transition metals with nucleic acids  
and their constituents  
Structure and Bonding 5, 41 (1968)
329. Weser, U. und J. Koolman  
Untersuchungen zur Proteinbiosynthese in Rattenleber-  
Zellkernen  
Z. Physiol. Chem. 350, 1273 (1969)
330. Weser, U., S. Seeber und P. Warnecke  
Zur Wirkung von  $Zn^{2+}$  auf die nucleare RNA- und Protein-  
biosynthese der Rattenleber  
Z. Naturforschung 24b, 866 (1969)
331. Weser, U. und H. Brauer  
Zinc-65 uptake by rat liver nuclei in presence of some  
chelating agents  
BBA 204, 542 (1970)

332. Wester, P.O.  
Concentration of 17 elements in subcellular fractions  
of beef heart tissue determined by neutron activation  
analysis  
BBA 109, 268 (1965)
333. Westerfeld, W.W.  
Effect of metalbinding agents on metalloproteins  
Fed. Proc. 20, Suppl. 10, 158 (1961)
334. Westmoreland, N., and W.G. Hoekstra  
Pathological defects in the epiphyseal cartilage of  
zinc- deficient chicks  
J. Nutr. 98, 76, 83 (1969)
335. Williams, R.B., C.F. Mills, J. Quarterman, and  
A.C. Dalgarno  
The effect of zinc deficiency on the in vivo incorpora-  
tion of P-32 into rat liver nucleotides  
Biochem. J. 95, 29P (1965)
336. Williams, R.B., and J.K. Chesters  
Effect of zinc deficiency on nucleic acids synthesis in  
the rat  
In: s. Mills (1970)
337. Williams, R.J.P.  
Nature and properties of metal ions of biological  
interest and their coordination compounds  
Fed. Proc. 20, Suppl. 10, 5. (1961)
338. Winder, F.G., and C. O'Hara  
Effects of iron and zinc deficiency on the composition  
of *Mycobacterium smegmatis*  
Biochem. J. 82, 99 (1962)
339. Winegrad, S.  
The localization of muscle calcium with regard to the  
myofibrils  
J. Gen. Physiol. 48, 997 (1965)
340. Withers, A.F.D., H. Baker, M. Musa, and T. Dormandy  
Plasma zinc in psoriasis  
Lancet 2, 278 (1968)
341. Wolff, H.  
Untersuchungen zur Pathophysiologie des Zinkstoffwech-  
sels  
Klin. Wochenschrift 34, 109 (1956)
342. Zboralski, W.  
Verfahren zur Behandlung von Fleisch, insbesondere  
Wurstbrät, mit Kationenaustauschern  
DBP 1 108 054; angem. 28.5.60; ausgeg. 8.9.1966

Am Ende dieser Arbeit danke ich Herrn Prof. Dr. W. Kreuzer für die Überlassung des Themas und die großzügige Gestaltung der Arbeitsmöglichkeiten. Den Herren Drr. Fischer, Schmidt, Schröder und Wißmath gilt mein herzlicher Dank für ihre fachmännischen wie freundlichen Ratschläge, der Leitung des Institutes, Herrn Prof. Dr. Dr. L. Kotter und Herrn Prof. Dr. G. Terplan für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes.

Für die Hilfe bei den Schreib- und Zeichenarbeiten bedanke ich mich bei Edith Teiöhreber, Ingrid Krebs, Hilde und Karl Schriefl und M.-W. Unsinn.

## Lebenslauf

Am 20. Oktober 1943 wurde ich, Paul Michael Unsinn, als Sohn des Schreinermeisters Michael Unsinn und seiner Ehefrau Magdalena, geb. Näher, in Nesselwang/Allgäu geboren. Nach dem Besuch der Volksschule Maria-Rain und des Humanistischen Gymnasiums Kempten legte ich 1964 die Reifeprüfung ab. Es folgten der Wehrdienst und ein zweiseimestriges Studium der Naturwissenschaften. Von 1966 bis 1972 studierte ich Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München. Mein Tierarztpraktikum leistete ich bei Dr. F. Feustel in Oy/Allgäu ab, mein Klinikpraktikum am Veterinary Hospital in Cambridge/England und mein Schlachthofpraktikum in Paris - LaVilette.

Die Dissertation wurde unterstützt mit einem Stipendium nach dem Graduiertenförderungsgesetz.

Seit dem 1. September 1974 arbeite ich am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch an dem Forschungsauftrag "Nachweis und Bildung von Nitrosaminen in Nahrungs- und Futtermitteln".





